

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤井 知行

平成26(2014)年 3月

目 次

I . 総括研究報告

- 母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究 ----- 1
藤井知行

II . 分担研究報告

- 1 . サイトメガロウイルス母子感染対策のための
妊婦スクリーニングにおけるCMV IgG Avidity Indexの
有用性の検討 ----- 19
山田秀人
- 2 . 富山大学産科婦人科におけるサイトメガロウイルスIgM陽性例
ならびにトキソプラズマIgM陽性例に対するAvidity検査 ----- 27
齋藤滋
- 3 . 母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究 ----- 29
鮫島浩
- 4 . 母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究 ----- 33
増崎英明
- 5 . 静岡県西部地区における過去15年間における
サイトメガロウイルス抗体保有率の推移 ----- 36
金山尚裕
- 6 . サイトメガロウイルス、トキソプラズマの母子感染
スクリーニングのためのAvidity検査導入を目指した
周産期施設における検査体制の確立とデータ保存に
関する研究 ----- 38
川名 敬
- 7 . CMV 核酸検査法の開発 ----- 42
井上直樹

8 .	サイトメガロウイルス血清型・DNA 型判別法を用いた 先天感染例の評価 錫谷達夫	-----	48
9 .	先天性CMV感染症診断サービスの構築 木村宏	-----	54
10 .	妊婦の抗体測定と胎児超音波診断による先天性サイトメガロ ウイルス感染症の予後予測 峰松俊夫	-----	60
11 .	症候性先天性サイトメガロウイルス感染児への抗ウイルス 療法の検討 森内浩幸	-----	66
12 .	母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究：尿からの CMV DNA 直接検出に関する基礎検討：real-time PCR 法と LAMP 法の比較 吉川哲史	-----	71
13 .	母子感染患者のフォローアップとレジストリに関する研究 岡明	-----	74
14 .	尿中サイトメガロウイルス検出のための PCR 検査標準化を 目指した研究 古谷野伸	-----	80
15 .	母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究 小林廉毅	-----	86
16 .	先天性サイトメガロウイルス感染の新生児における 出生時の症候性と関連する臨床検査データの検討 森岡一朗	-----	90
III .	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	99
IV .	研究成果の刊行物・別刷	-----	101

母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究

研究代表者 藤井 知行 東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科 教授

【研究要旨】

サイトメガロウイルス(CMV)とトキソプラズマの母子感染についての包括的な医療体制の基盤となる医療技術の開発、特にCMVの感染児尿DNA診断法の確立と妊婦での血清学的なハイリスク診断であるAvidity検査法の有用性の検証と標準的診断薬としての開発、また、母子感染リスク評価法およびフォロー体制の確立を研究の目的とした。平成25年度は計画通りに進捗し、研究倫理申請および全体の研究班の役割分担等を完了し、後ろ向きおよび前向き研究の両方について開始することができた。新生児CMV診断開発およびハイリスク妊婦診断の血清学的Avidity検査法について、各研究施設での研究倫理承認をほぼ終えることができた。また、検査法開発に参加する共同研究企業の選定を行い、その結果、新生児CMV診断開発3社、血清学的Avidity検査法4社の計7社と東京大学の間で共同研究契約を結んだ。新生児CMV診断については、計画通り検査法のValidationの第一段階が終了し、今後生体試料での検定に進む予定となっている。新生児CMV診断の中央検査体制およびレジストリは開始準備が終了した。診断サービスはインターネット上で情報提供を行う準備が終了し、今後国内医療機関から依頼を受けハイリスク児の確定診断を行うことになっている。感染陽性患児については、研究班として地域を分担して班員が対応について相談を行う体制を作成した。また、レジストリを含むフォローアップについて研究班として統一した方針を確定した。妊婦での母子感染リスク評価法のためのハイリスク妊婦の血清学的Avidity検査法については、班員各施設での感染者の保存検体について調査を行った。その提供を受け、個人情報保護の上で、参加希望各社の検査法・検査キットの検定比較を行う準備を終了した。CMVのAvidity検査については、IgG陽転が確認された初感染の妊婦血清を用いた前向き研究を、トキソプラズマのAvidity検査についてはIgM陽性が確認された妊婦血清を用いた前向き研究を、それぞれ開始し、患者登録および検体の収集を現在行っている。感染疑い妊婦の血清学的Avidity検査による母子感染リスク診断については、研究班として準備を終え、開始している。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

研究分担者

山田 秀人・
神戸大学大学院医学系研究科・教授

齋藤 滋・
富山大学大学院医学薬学研究部・教授

鮫島 浩・
宮崎大学医学部・教授

増崎 英明・
長崎大学大学院医師薬学総合研究科・教授

金山 尚裕・
浜松医科大学・教授

川名 敬・
東京大学医学部附属病院・准教授

井上 直樹・
岐阜薬科大学・教授

錫谷 達夫・
福島県立医科大学・教授

木村 宏・
名古屋大学大学院医学系研究科・教授

峰松 俊夫・
愛泉会日南病院疾病制御研究所・所長

森内 浩幸・
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染症免疫学・教授

吉川 哲史・
藤田保健衛生大学医学部・教授

岡 明・
東京大学医学部附属病院・教授

古谷野 伸・
旭川医科大学・講師

小林 廉毅・
東京大学大学院医学系研究科・教授

森岡 一郎・
神戸大学附属病院周産母子センター・教授

研究協力者

川名 尚
帝京大学溝口病院・教授

小島 俊行
三井記念病院・部長

山口 暁
成和会山口病院・院長

A . 研究目的

妊婦のウイルスや原虫の感染は胎盤を通じて胎児への移行することがあり、児にTORCH症候群等の様な重篤な全身感染症を来す。母子感染症による後遺症としては中枢神経系、聴覚系、視覚系など多岐に渡るが、こうした後遺症は早期介入・治療により予後改善が可能であることが示されてきており、今後、予防、診断、治療の包括的な母子感染医療体制の構築が求められている。

母子感染については研究レベルで新たな診断や治療技術が開発されてきているが、我が国の臨床医療技術としては導入されておらず、医療現場での混乱を来している。特に頻度が高いサイトメガロウイルス(CMV)については、厚生労働科学研究として行われた新生児スクリーニング調査によって、我が国で現在 300 人に 1 人という高い率で発生していることが分かった (Koyano S, et al 2011)。しかし我が国では妊婦の血清学的なハイリスク診断技術である Avidity 検査は未承認であり、また、新生児の確定診断である尿 DNA 診断技術についても未承認となっている。また先天性 CMV 感染児の治療については、海外では難聴などの症候性の児に対する抗ウイルス治療の治験が積極的に行われており、我が国でも施設単位での投与が行われているが実態は不明である。一方、トキソプラズマ感染は、頻度はより低いものの、その実態は不明である。すでに海外では薬剤による治療が一般化している現状があるが、国内での販売がなく未解決の問題である。さらに、我が国では妊婦での血清学的なハイリスク診断技術である Avidity 検査は未承認である。こうした現状の問題点を解決するために、本研究では、CMV とトキソプラズマの母子感染についての包括的な医療体制の基

盤となる医療技術の開発を行う。妊婦での母子感染リスク評価法とフォロー体制を確立するために、妊婦での血清学的なハイリスク診断である Avidity 検査法の有用性を検証し標準的診断薬としての開発を行うとともに、感染児の診断法についても CMV の尿 DNA 診断の確立を目指す。また、実態把握の強化と基盤情報を集積しエビデンスに基づく将来の治療を可能とするために、感染児のレジストリ制度を構築し、治療等についても国内で協力し相談が可能な体制作りを行う。

B. 研究方法

(1) 新生児 CMV 診断開発と中央検査体制 (井上・古谷野・木村・岡・小林)

CMV 感染症の DNA 診断技術の体外診断用医薬品化に向けた開発

リアルタイム PCR 法等による尿中 CMV DNA 検出による確定診断法について、参加希望メーカーを募りその上、検査の Validation 作業を行った。また、新生児に対する CMV スクリーニング法が実用的技術として利用可能となるようにするため、尿採取紙の選定を行った。

先天性 CMV 感染疑い症例の DNA 診断

研究班として相談を受け Central Laboratory が検査を行い、診断可能な体制を作った。

(2) 妊婦診断開発と中央検査体制 (鍋谷・峰松・井上 / 山田・齋藤・鮫島・増崎、金山・川名敬・小林・川名尚・小島・山口)

CMV の Avidity 検査開発

感染者の保存検体および妊娠経過中に IgG 陽転が確認された初感染の妊婦血清を用いて、共同研究企業各社の検査法・検査キットの検定比較・統計解析を行い、Avidity 検査の標準化と臨床的有用性等の評価を行うため、臨床検体収集手順を決定した。

トキソプラズマの Avidity 検査開発

感染者の保存検体および妊娠経過中に IgM 陽性

が確認された初感染の妊婦血清を用いて、共同研究企業各社の検査法・検査キットの検定比較・統計解析を行い、Avidity 検査の標準化を行うため、臨床検体収集手順を決定した。

感染疑い妊婦の中央検査体制

研究班として相談を受けた症例に対し、Central Laboratory が検査を行い、診断するための国内体制を作成した。

(3) 感染児レジストリ・治療薬開発・コホート調査 (岡・森内・森岡・古谷野・木村・小林) 感染児レジストリ、および先天性 CMV 感染コホートの予後調査

研究班の立ち上げに際して、当研究班で診断を行った児についてのレジストリを行うための準備を行った。また、先天性 CMV フォローアップ推奨時期内容を調整した

治療薬開発

抗ウイルス剤バルガンシクロビルによる CMV 治療について、血中濃度推移、ウイルス学的・臨床的有効性、副作用の評価を行った。

(4) CMV とトキソプラズマの母子感染の国内相談体制 (藤井・小島・山田・森内・吉川・他) 相談指針の作成

感染の可能性がある妊婦に情報提供を行なう指針作成の手順を決定した。

感染予防に向けた妊婦への予防啓発

母子感染予防についての一般向けパンフレットを班として作成する手順を決定した。

(5) CMV とトキソプラズマの母子感染の基礎的、臨床的研究 (各研究者)

本班研究目的達成のための基礎研究、臨床的研究を、各研究者が行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、個人情報管理に万全を期して実施した。検査法の研究開発ならびに研究班とし

での検査施行、コホート群でフォローアップについては、文書による説明および同意書などについて、当該医療機関の倫理委員会での審査承認を受けて行った。また、研究の公開、個人情報の保護など臨床研究に関する倫理指針を遵守している。また患者の匿名化により患者に不利益が及ぶ可能性を排除した。患者の人権擁護、個人情報の保護、データベースの機密性等については特に注意を払いこれを保証している。また研究者の利益相反管理の申出を、研究者の所属医療機関での利益相反委員会あるいは倫理委員会に対して行った。

C . 研究結果

(1) 新生児CMV診断開発と中央検査体制

CMV感染症のDNA診断技術の体外診断用医薬品化に向けた開発

i) 検査のvalidation (井上)

3社が参画することになり、研究代表（東大）と共同研究契約を締結した。薬事も交え、評価手順を数回の会議で決定。手順に基づき、性能試験を以下の通り進行させた。ただ、今後の研究進捗状況により、参画企業が変更となる可能性がある。

a) WHO標準品を元にウイルス標準品及びその精製DNA標品を作製し配布、この標準品を用いて、2社について、予定検査法に問題がないことを確認した。

b) 新生児尿に標準品をスパイクしたものを用意。申請用性能試験（主に感度評価）を実施した。核酸検査及びウイルス分離（約1ヶ月培養）で、新生児尿17検体の陰性を確認した。また核酸精製過程を入れない検査法（シノテスト、栄研化学）での上記尿検体の核酸増幅反応阻害の有無をテストし、1検体で強く阻害、1検体で弱く阻害、尿量を減せば問題なしと判明した。

c) CMV陰性新生児尿及び標準品をスパイクした新生児尿プールの配布準備を完了した。

d) 各社のキットを用いた性能試験を2社分につ

いては行っている。

ii) CMVスクリーニング検査法の開発（井上）

尿を採取するための濾紙の再選定を行い、価格・安全性・簡便を改善し商業化に一步近づいた。尿を採取する約20種類の濾紙から、界面活性剤等塗布なし、洗浄過程排除、感度維持、の3条件を満たす濾紙2種類を同定し、感染児1名の採尿テストで、かぶれ・感度などの問題はなかったが、着色の必要性が明確になった。選定濾紙の着色（食品添加物登録品）見本を試作依頼し、青・黄2色で良好な結果を得た。濾紙メーカーと価格・仕様を協議中である。

先天性CMV感染疑い症例のDNA診断

インターネット上で情報提供を行う準備が終了し、今後国内医療機関から依頼を受けハイリスク児の確定診断を行う体制を整えた。感染陽性患児については、研究班として地域を分担して班員が対応について相談を行う体制を確立した。

(2) 妊婦診断開発と中央検査体制

4社が参画することになり、研究代表（東大）と共同研究契約を締結した。ただ、今後の研究進捗状況により、参画企業が変更となる可能性がある。

CMVのAvidity検査開発

各研究施設で倫理申請を行い、申請が承認された施設において、順次研究を開始している。保存検体については、班員各施設での感染者の保存検体について調査を行い、また必要検体量を調査した。今後、その提供を受け、個人情報を保護した上で、参加希望各社の検査法・検査キットの検定比較を行う準備を終了した。avidity 低、中、高値の3群検体を各例ずつ、500microL(少量しかない場合は150microL)使用することに決め、現在、作業中である。

また、IgG陽転が確認された初感染の妊婦血清を用いた前向き研究については、各研究施設で倫理申請承認後、順次、妊婦登録、検体収集を開始した。その結果、妊娠初期の検査において、妊婦

の約70～80%がCMV IgG抗体陽性であること、またIgM抗体陽性者が約5%であることが確認された。しかし、IgM陽性者のほぼすべてのavidity検査により、妊娠中の感染が否定的とされ、真の妊娠中の感染者の検出は従来のIgMを基準にする方法では困難であることが明らかとなった。現在、登録症例の妊娠経過を観察中であり、妊娠末期検査での陽転者の妊娠中の全採取血清を研究に使用する予定である。

トキソプラズマの Avidity 検査開発

各研究施設で倫理申請を行い、申請が承認された施設において、順次研究を開始している。保存検体については、班員各施設での感染者の保存検体について調査を行い、また必要検体量を調査した。今後、その提供を受け、個人情報保護した上で、参加希望各社の検査法・検査キットの検定比較を行う準備を終了した。avidity 低、中、高値の3群検体を各例ずつ、500microL(少量しかない場合は150microL)使用することに決め、現在、作業中である。各研究施設で倫理申請を行い、順次、妊婦登録を開始した。また、保存検体については、必要検体量を調査した。IgM陽性が確認された妊婦血清を用いた前向き研究については、各研究施設で倫理申請承認後、順次、妊婦登録、検体収集を開始した。その結果、妊娠初期の検査において、IgM陽性者は約0.3%と少なく、感染疑い例が少ないことがわかった。保存検体による検討が必須であることが判明した。

感染疑い妊婦の中央検査体制

依頼を受けた感染疑い妊婦に対してAvidity検査による初感染リスク評価を行う体制を整え、サービスを開始した。各臨床施設において、結果の説明については十分な情報提供と相談等配慮を行っている。

(3) 感染児レジストリ・治療薬開発・コホート調査

感染児レジストリ

研究班による診断体制と患者レジストリ体制を

作成し(図1)感染児のフォローアップについて、先天性CMVフォローアップ推奨時期内容を調整した(図2)。

図1 先天性CMV・トキソ感染児レジストリ診断サービスと全国の患者情報の集約

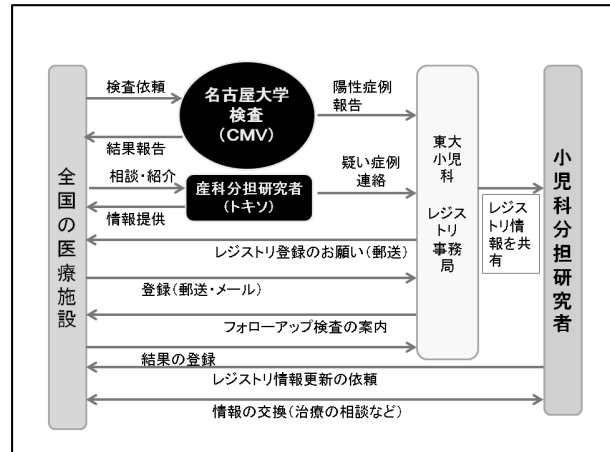


図2 母子感染フォローアップ推奨スケジュール

* : 前回異常を指摘された場合に施行										
	初診+1 か月	3~4 か月	6か月	1歳	1歳6 か月	2歳	3歳	4歳	5歳	6歳
診察 発達評価										
血算、肝 機能			*	*	*					
ウイルス (尿、血液)										
ABR										
頭部MRI					*					
発達検査 など				KIDS	KIDS	KIDS	KIDS	KIDS	KIDS	WISC CBCL
その他 頭部超 音波 眼底検 査					新版K 式?					

また、先天性CMVについては表1の、先天性トキソプラズマについては表2の情報を収集することとした。

表1 先天性CMV レジストリ項目

- ・ 個人情報：氏名、性別、住所、電話番号、
- ・ フォローアップ施設：担当施設、病院ID
- ・ 紹介施設：紹介施設、紹介医師、紹介医師Email、施設住所、電話番号
- ・ 出生情報：生年月日、アプガースコア、出生週数、出生時体重・身長・頭囲

- ・ 妊娠経過等：母妊娠歴、同胞数、出産時年齢、子宮内発育不全（時期）胎児エコー所見、妊娠中CMV感染（判定根拠）
 - ・ 新生児期：CMV血清IgM、IgG、頭部画像異常、小頭症（SD）肝障害（ALT数値）血小板減少
 - ・ aABR（日付、結果）
 - ・ ABR（日付、年齢、結果、左右dB）
 - ・ 眼底検査（検査日時、所見）
 - ・ ウイルス量（日付、血液、尿）肝機能（血液ALT、日付）
 - ・ 頭部画像（検査日付、年齢、画像種類、画像結果*、画像結果コメント）
- * 石灰化、脳室拡大、脳萎縮、形成異常、白質変化、上衣下偽性嚢胞、その他
- ・ 治療
 - ・ 発達検査（検査日付、暦年齢、検査種類、IQ-DQ、検査コメント）
 - ・ 情緒行動評価：CBCL（検査日付、年齢、コメント）

- 白質変化、上衣下偽性嚢胞、その他
- ・ 発達検査（検査日付、暦年齢、検査種類、IQ-DQ、検査コメント）
 - ・ 情緒行動評価：CBCL（検査日付、年齢、コメント）

治療薬開発（森内）

バルガンシクロビル療法は、ほとんどの症例でウイルス学的有効性を示した。臨床的予後判定には時期尚早だが、難聴の進行を抑制または改善する効果は期待できそうである。副作用として、好中球現象が比較的多く見られ、特に早期産児・低出生体重児では出やすい傾向が認められたが、適切なモニタリングと休薬によって対応可能と思われた。血中濃度には個体差が大きく、一部の症例では期待されるピーク値に達しなかったが、その原因は不明である。臨床的にガンシクロビル・バルガンシクロビルに低感受性または耐性と思われる症例が散見された。（図3、4）

図3

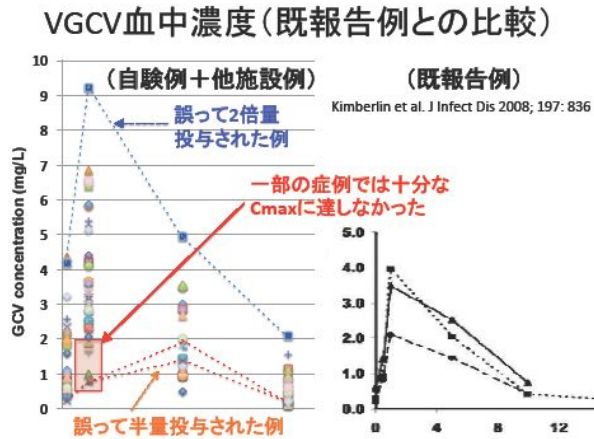
- 表2 先天性トキソ レジストリ項目
- ・ 個人情報：氏名、性別、住所、電話番号、
 - ・ フォローアップ施設：担当施設、病院ID
 - ・ 紹介施設：紹介施設、紹介医師、紹介医師Email、施設住所、電話番号
 - ・ 出生情報：生年月日、アプガースコア、出生週数、出生時体重・身長・頭囲
 - ・ 妊娠経過等：母妊娠歴、同胞数、出産時年齢、子宮内発育不全（時期）胎児エコー所見、妊娠中トキソ感染（判定根拠）治療
 - ・ 新生児期：トキソ血清IgM、IgG、頭部画像異常、小頭症（SD）肝障害（ALT数値）血小板減少
 - ・ 眼底検査（検査日時、所見）
 - ・ 血液検査経過：トキソIgM、IgG、ALT
 - ・ 治療
 - ・ 頭部画像（検査日付、年齢、画像種類、画像結果*、画像結果コメント）
- * 石灰化、脳室拡大、脳萎縮、形成異常、

症候性先天性CMV感染症に対するVGCV療法
- 自施設および他施設例（合計51例）のまとめ -

ウイルス学的効果	有効	36	ウイルス血症が消失
	やや有効	5	Viral loadが1-2 log以上減少するもウイルス血症は残存
	未確認	10	
副作用	なし	32	
	あり	12 ^a	好中球減少(4例 ^a で休薬を要した)
	未確認	7	
Cmax (mg/L)	<2	6 ^b	上記の有効例も2例
	2-5	34	上記のやや有効例も2例
	5<	8 ^c	上記のやや有効例も1例

^aa. 二倍量投与の1例を除く。 ^bb. 半量投与の2例を除く。
^cc. 二倍量投与の1例を除く。

図 4



(4) CMV とトキソプラズマの母子感染の国内相談体制：

相談指針の作成

指針作成を、山田、小島を中心に作成することとした。

感染予防に向けた妊婦への予防啓発

母子感染予防について的一般向けパンフレットを、山田、小島を中心に作成することとした。

(5) CMV とトキソプラズマの母子感染の基礎的、臨床的研究：

サイトメガロウイルス母子感染対策のための妊婦スクリーニングにおける CMV IgG Avidity Index の有用性の検討 (山田)

妊婦の CMV IgG Avidity Index (AI) 値で、先天性 CMV 感染の発生を予知可能か検討するため、前方視的コホート研究として、CMV IgG 陽性の妊婦 759 人を対象に CMV IgG AI を測定し、全例で新生児尿 CMV DNA を検査した。基準値を設定し、先天性 CMV 感染に対する AI の感度、特異度を調べた。その結果、先天性感染 14 人の AI 中央値 35.1%は、非感染 745 人の 70.4%より有意に低値であった。ROC 解析から AI <40%を基準値とした。妊娠 28 週未満で、感度 (88.9%) は最高となり、特異度 96.2%、陰性的中率 99.8%、

陽性的中率 27.6%であった。この結果より、妊娠中、特に 28 週未満で CMV IgG AI <40%の場合、先天性 CMV 感染発生の可能性が高くなることが判明した。

富山大学産科婦人科におけるサイトメガロウイルスIgM陽性例ならびにトキソプラズマIgM陽性例に対するAvidity検査 (斎藤)

サイトメガロウイルス (CMV) の感染既往のない妊婦が30%以上に増加しており、これらの CMV-IgG抗体陰性妊婦から出生した児の300人に1人にCMV母子感染が生じているという報告もある。そこで、妊娠初期にCMV-IgG抗体、IgM抗体を測定し、IgM抗体陽性、IgG抗体陽性例の8例に対してAvidity検査を行なった。1例にAvidity検査が30.1%と初感染の可能性が高い症例が認められた。トキソプラズマ抗体価がPHA法で20,480倍であったため、トキソプラズマ抗体価を測定したところ、IgG 73、IgM 1.8と共に陽性であったため、Avidity検査を行ない、現在結果待ちの状態にある。

静岡県西部地区における過去15年間におけるサイトメガロウイルス抗体保有率の推移 (金山)

静岡県西部地区の産婦人科医会の協力を得て妊婦 CMV 抗体保有率の調査を 1996 年より開始した。1996 年 6 月より 2011 年 12 月までに検査を受けた妊婦 20,508 人の CMV 抗体保有率について報告する。今回の結果では 1996 年から 1999 年までは 77.4%、2000 年から 2002 年までは 72.8%、2003 年から 2005 年までは 69.6%、2006 年から 2008 年は 70.7%、2009 年から 2011 年までは 66.7%であり、妊婦 CMV 抗体保有率は明らかに低下していた。上記 20,508 人中 IgG 抗体陰性で妊娠後期に再検したのは 1443 人であった。そのうち妊娠中に IgG が陽転化した人は 28 人いた。28 人のうち新生児尿の CMVPCR が検査できたのは 23 例で PCR 陽性者は 5 人であった。妊婦 CMV 抗体保有率は年とともに低下していることが多数例の検討から明らかになった。妊娠中に CMV に初感染した妊婦は

妊娠初期に CMV IgG 抗体陰性妊婦のうち 1.9%(28 人)であった。そのうち 23 例に新生児尿の PCR が行われ、0.3%(5 例)に感染が認められた。

サイトメガロウイルス、トキソプラズマの母子感染スクリーニングのための Avidity 検査導入を目指した周産期施設における検査体制の確立とデータ保存 に関する研究 (川名敬)

妊婦健診におけるサイトメガロウイルス (CMV) およびトキソプラズマ (TOX) の母児感染スクリーニング検査の導入と、そのために必要なデータ保存体制の確立を目的として分担研究を開始した。すでに体外診断の承認を受けている血清 IgG、IgM 測定キットによる母体血清中の値をもとにこれまで約 300 例に対してスクリーニングを行った。CMV について妊娠女性の IgG 陽性率は 76%であった。血清 IgM の陽性者が 5%存在したが Avidity 検査による感染時期の推定では妊娠中の感染は全例で否定的であった。そのため、臨床的対応が必要となる真の妊娠中の感染者の検出は従来の IgM を基準にする方法では困難であることが明らかとなった。TOX については IgM 陽性者は 0.3%で感染疑い例が少なく、症例を蓄積した上でのスクリーニング法の有効性の評価が必要である。

先天性 CMV 感染症発症リスクとしての NK 受容体の遺伝子多型に関する研究 (井上)

発症リスクとして同定した NK 受容体の遺伝子多型について、その分子機序の解析を行ったが、MICA の結合や Akt のリン酸化などシグナル伝達系の上流には大きな差は見られなかった。

サイトメガロウイルス血清型・DNA 型判別法を用いた先天感染例の評価 (錫谷)

先天性 サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus; CMV) 感染は出産 300 例中 1 例に認められ、既知の胎内感染で最も頻度が高い。出生時に顕性感染である 1 割には小頭症などの重篤な異常が起こっている。感染児の 9 割は出生時に無症候性であり感染を認知することはないが、そのうち 5-15%では成長に伴って難聴、精神発達遅延などの症状が出現している。

妊婦において CMV 初感染が起こった場合、その 4 割で胎児に感染が認められる。先天感染は CMV 重感染によっても引き起こされることが知られているが、どの位が重感染によるものであるのかも明らかにされていない。我々は ELISA 法を用いた CMV 血清型別判定法、リアルタイム PCR 法を用いた感染児尿中 CMV 型判定法を確立し、先天性 CMV 感染が妊娠中の CMV 初感染によるのか、異型 CMV の重感染によるのか、判別を行った。先天性 CMV 感染児とその母親 18 例の CMV 感染パターン解析を行ったところ、異型 CMV の重感染によると考えられる 2 例を見出した。我々の方法で判別できる CMV の型分けの精度では初感染または再活性化が 89%、重感染が 11%であった。

先天性 CMV 感染の診断法の標準化 (木村)

National Institute for biological Standards and Control から購入した国際標準物質 (HCMV Merlin 株の凍結乾燥製剤) を、CMV DNA が検出されないヒト尿に希釈し、DNA 抽出した後、リアルタイム PCR 法を用いて CMV DNA 定量を行った (Wada, J Clin Microbiol, 2007)。各サンプルを duplicate で測定し、計 4 回の測定結果を平均した。この検討より、臨床検体の測定結果を「IU (国際単位)」表記とした。続いて、先天性 CMV 感染症と過去に診断されている患者の尿を用い、リアルタイム PCR 法にて CMV DNA を測定した。対照に血清学的に CMV 未感染の乳児の尿を用いた。

自施設の系を国際標準物質でキャリブレーションした結果、CMV DNA 量は 1 コピー/mL (自施設) = 2.5 IU/mL であった。先天性 CMV 感染症児の尿から、多量の CMV DNA が検出された。一方、非感染児の尿からは CMV DNA は検出されなかった。

妊婦の抗体測定と胎児超音波診断による先天性サイトメガロウイルス感染症の予後予測 (嶋松)

現在、先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染の妊娠中の検査として、母体の血清学的検査、胎児検体のウイルス学的検査、胎児の超音

波画像検査が実施されている。これらの検査のうち、胎児検体を用いるウイルス学的検査は妊娠に対しての侵襲性が高い。そこで、先天性 CMV 感染症の発症・予後の予想が血清学的診断と胎児超音波検査の組み合わせで可能かを検討した。

出生児 1163 名のうち、胎内 CMV 感染は 5 名(先天性 CMV 感染発生率 0.43%) だった。そのうち症候性感染は 2 名(先天性 CMV 感染症発生率 0.17%) であり、1 名が重症先天性 CMV 感染症と診断され、残りの 1 名が感音性難聴となった。これら症候性感染となった 2 名は、妊娠初期に IgM 抗体陽性、Avidity Index 低値の初感染妊婦から出生しており、重症児は胎児超音波診断においても頭部・腹部超音波異常を示していた。

今回の我々の研究では、抗 CMV IgG 抗体の Avidity Index 測定、IgM 抗体の検出、および胎児超音波診断の所見を総合的に判断すれば、CMV 感染児の予後判断に役立てられる可能性が示唆された。

尿からの CMV DNA 直接検出に関する基礎検討：real-time PCR 法と LAMP 法の比較(吉川)

サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus: CMV) についての、診断、治療に関する技術開発ならびに実際の臨床応用に向けた橋渡し研究を行うことを目的として以下の検討を行った。先行する藤枝班、山田班の研究期間中に先天性 CMV 感染と診断された患児 11 名ならびに同胞 1 名から採取した尿 18 検体を用いて (患児保護者からの同意取得済み)、QIAamp DNA blood mini kit を使用して DNA 抽出した場合と、尿を直接検体として使用した場合で、real-time PCR 法と LAMP 法での CMV DNA 検出について解析した。その結果、予想通り LAMP 法では CMV DNA 陽性となっても、real-time PCR 法では陰性となる検体がみられた。よって、LAMP 法は尿から DNA 抽出することなく直接 CMV DNA 検出が可能で、先天性 CMV 感染の迅速かつ簡便な診断法となりえると思われる。

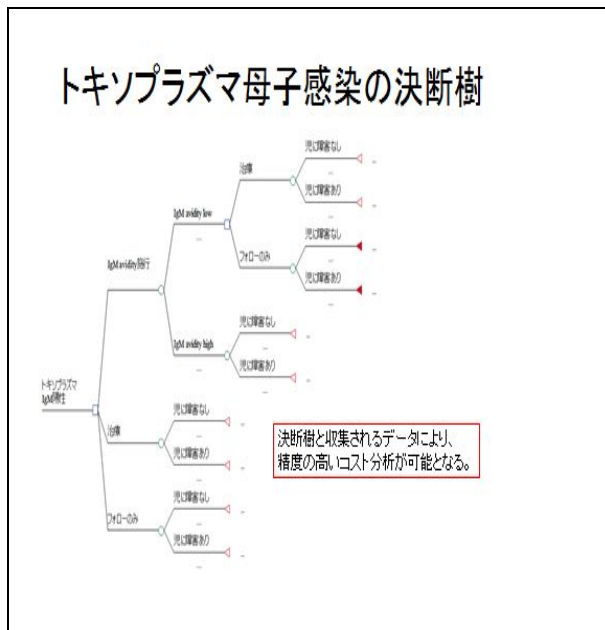
尿中サイトメガロウイルス検出のための PCR 検査標準化を目指した研究 (古谷野)

旭川医科大学病院で親御さんからの同意の得られた 1 歳から 5 歳までの小児の残血清と尿を提供いただいた。血清は CMV に対する抗体を ELISA 法で測定し、尿は Real-time PCR を行って CMV DNA 量を測定した。現在までに 15 名の小児から検体を提供いただいた。そのうち CMV-IgG が陽性で既感染と思われる小児は 7 名、未感染児は 8 名であった。尿中 CMV に関しては、実験室の都合でまだ未施行であるが、準備が整い次第実施する予定である。

母子感染スクリーニングに関わる決断樹の作成 (小林)

サイトメガロウイルス症と先天性サイトメガロウイルス症に係わる母子感染の予防・治療の決断樹を作成した。図 5 に、トキソプラズマの決断樹を示す。

図 5 トキソプラズマ母子感染の決断樹



先天性サイトメガロウイルス感染の新生児における出生時の症候性と関連する臨床検査データの検討 (森岡、山田)

先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症において、症候性と関連する臨床検査データの特徴を見出すことを目的とした。対象は、生後 1 週間以内の尿で CMV-DNA 陽性を確認し、先天性 CMV 感染と確定診断した新生児 23 人(症候性 10 人、無症候性 13 人)、血中総 IgM、CMV-IgM、

CMV 抗原陽性白血球 (C7-HRP 法)、血液・尿 CMV-DNA を同時に定量し、その陽性の割合や定量値を症候性児と無症候性児で比較した。各検査が陽性であった児の割合は、総 IgM 74%、CMV-IgM 52%、CMV 抗原陽性白血球 44%、血液 CMV-DNA 96%、尿 CMV-DNA 100%であった。症候性/無症候性児の比較では、総 IgM の陽性児の割合と総 IgM 値は、症候性児は無症候性児に比して有意に低かった。一方、症候性児の血液 CMV-DNA 値は、無症候性児に比較して有意に高値であった。先天性 CMV 感染の新生児において、総 IgM 値が低く血中 CMV 量が多いことが、症候性と関連があった。

帝京大学溝口病院での Avidity Index 測定法と今年度までの検体数 (川名尚)

トキソプラズマはプラテリアトキソ IgG (バイオ・ラッド) サイトメガロウイルスはウイルス抗体 EIA「生研」サイトメガロ IgG (デンカ生研) を用い、6M 尿素を用いて結合抗体を解離させ結合力 (AI) を測定した。トキソプラズマは、486 検体について測定し最低値 12.3%、最高値 84.4% に分布した。サイトメガロウイルスは 196 検体について測定し、最低値 24.9%、最高値 96.9% に分布した。

妊婦における抗サイトメガロウイルス IgG 抗体スクリーニング (山口)

2009 年 5 月から 2013 年 6 月までに当院で分娩し、妊娠中に CMV スクリーニングを実施しえた、妊婦 6316 例を対象とした。妊娠初期に CMV 抗体スクリーニング検査を実施し、初回検査で陰性例については、CMV 感染予防のため妊娠中の生活指導を行ったうえで、妊娠後期に感染の有無を確認するため再度 CMV 抗体測定を行ない、妊娠中の抗体陽性化例では、新生児尿中 CMV を検索した。また、CMV の抗体保有率を、経産数、年齢別に検討した。対象全体の CMV 抗体の保有率は、69.1% (4353 例/6316 例) であった。CMV 抗体保有率を母体年齢別に検討すると、20 歳以下群 71% (30 例/42 例) 20-24 歳群 64.3% (252 例/392 例) 25-29 歳群 67.9% (1056 例/1557 例) 30-34 歳群 69.1% (1723 例/2493 例) 35-39 歳

群 69.9% (1101 例/1576 例) 40 歳以上群 74.6% (191 例/256 例) であった。20-24 歳群と 40 歳以上群の抗体保有率には有意差が認められた ($P=0.005$, 2x2 Chi square test) が、年齢増加と抗体保有率に正の相関関係は認められなかった。経産回数別の CMV 抗体保有率は、初産では 67.2% (2218 例/3303 例) 2 回経産 74.1% (443 例/598 例) 3 回経産 76.4% (68 例/89 例) 4 回以上の経産婦 90.5% (19 例/21 例) 上昇した。妊娠中の抗体陽性化認めた症例は、0.06% (4 例/6316 例) で、この 4 例中 2 例は新生児尿から CMV が検出され、小児科フォロー中である。また、2 回以上の妊娠、分娩にわたって CMV 抗体スクリーニングが可能な症例が 381 例あった。この 381 例のうち前回妊娠時に CMV 抗体陰性例は 128 例で、6.3% (8 例/128 例) では次回の妊娠時のスクリーニングでは、CMV 抗体が陽性化していた。

D . 考察

平成 25 年度は計画通りに進捗し、研究倫理申請および全体の研究班の役割分担等を完了し、後ろ向きおよび前向き研究の両方について開始することができた。特に妊婦血清検査においては、多くの妊婦が CMV 未感染で、妊娠中初感染リスクを持っていること、IgM 抗体が感染時期の推定に無力であることが分かり、本研究の重要性が再確認された。

平成 26 年度は 25 年度より開始した妊婦での血清学的なハイリスク診断である Avidity 検査法の有用性の検証と標準的診断薬としての開発を継続して行うとともに、感染児の診断法についても CMV の尿 DNA 診断法の確立を継続して行う。また、実態把握の強化と基盤情報を集積するため、感染児のレジストリ制度を運用し、治療等についても国内で協力し相談が可能な体制作りを行う。こうした母子感染の新規の技術を組み入れた包括的医療体制は海外でも確立しておらず、新規技術のイノベーションとして技術の標準化や有効性の検証などを先駆けて行うものであり、少子化の中で安心して子供を出産で

きる施策の一翼を担うことができると考えられる。

E . 結論

CMV およびトキソプラズマ母子感染の実態把握及び検査・治療に関する本研究の重要性が再確認された。次年度以降、さらに研究を継続する必要性が示された。

F . 健康危険情報

なし。

G . 研究発表

1.論文発表

- 1) Ebina Y, Minematsu T, Sonoyama A, Morioka I, Inoue N, Tairaku S, Nagamata S, Tanimura K, Morizane M, Deguchi M, Yamada H. The IgG avidity value for the prediction of congenital cytomegalovirus infection in a prospective cohort study. J Perinat Med. In press, 2014
- 2) Morioka I, Sonoyama A, Tairaku S, Ebina Y, Nagamata T, Morizane M, Tanimura K, Iijima K, Yamada H. Awareness of and knowledge about mother-to-child infections in Japanese pregnant women. Congenit Anom, 54, 35-40, 2014
- 3) Yamada H, Tairaku S, Morioka I, Ebina Y, Sonoyama A, Tanimura K, Deguchi M, Nagamata S. A nationwide survey of maternal screening for mother-to-child infections in Japan. Congenit Anom. doi:10.1111/ cga.12044, 2013
- 4) Saito S, Minakami H, Nakai A, Unno N, Kubo T, Yoshimura Y. Outcomes of infants exposed to oseltamivir or zanamivir in utero during pandemic (H1N1) 2009. Am J Obstet Gynecol. 2013 ;209:130.e1-9.
- 5) Yoneda N, Shiozaki A, Miura K, Yonezawa R, Takemura K, Yoneda S, Masuzaki H, Saito S. A triploid partial mole placenta from paternal isodisomy with a diploid fetus derived from one sperm and one oocyte may have caused angiogenic imbalance leading to preeclampsia-like symptoms at 19 weeks of gestation. Placenta. 2013;34:631-634.
- 6) Inada K, Shima T, Nakashima A, Aoki K, Ito M, Saito S. Characterization of regulatory T cells in decidua of miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content. J Reprod Immunol. 2013; 97:104-111.
- 7) Nakashima A, Yamanaka-Tatematsu M, Fujita N, Koizumi K, Shima T, Yoshida T, Nikaido T, Okamoto A, Yoshimori T, Saito S. Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia. Autophagy. 2013; 9:303-316.
- 8) Saito S., Shima T., Inada K., Nakashima A. Which Types of Regulatory T cells Play Important Roles in Implantation and Pregnancy Maintenance? Am J Reprod Immunol. 2013 ;69:340-345.
- 9) Saito S, Nakashima A. Review: The role of autophagy in extravillous trophoblast function under hypoxia. Placenta,2013; 27:S79-S84
- 10) Shiozaki A, Matsuda Y, Satoh S, Saito S. Comparison of risk factors for gestational hypertension and preeclampsia in Japanese singleton pregnancies. J.Obstet Gynecol Res. 2013; 39:492-499.
- 11) Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A, Miura S, Yamasaki K, Yoshiura K, Masuzaki H. Initial viral load in cases of single

human papillomavirus 16 or 52 persistent infection is associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix. *J Med Virol.* 2013;85:2093-2100.

- 12) Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H.: Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer. *J Hum Genet.* 2013;58(5):250-3.
- 13) H Moriuchi, H Masuzaki, H Doi and S Katamine: Mother-to-child Transmission of Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1. *The Pediatric Infectious Disease Journal* Vol.32, Number2, Feb p175-177, 2013.
- 14) Taguchi A, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, Nagasaka K, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Koga K, Wada-Hiraike O, Oda K, Kang JX, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T, Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acid in vitro and in vivo, *PLOS One*, in-press, 2014
- 15) Taguchi A, Wada-Hiraike O, Kawana K, Koga K, Yamashita A, Shirane A, Urata Y, Kozuma S, Osuga Y, Fujii T, Activation of SIRT1 by resveratrol suppresses inflammatory responses in endometriosis, *J Obstet and Gynecol Res*, E-pub, 2013
- 16) Yamashita A, Kawana K, Tomio K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Masuda K, Furuya H, Nagamatsu T, Nagasaka K, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yamashita T, Taketani Y, Kang JX, Kozuma S, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T, Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth, *Sci Rep*, E-pub, 2013
- 17) Tomio K, Kawana K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Yamashita A, Kojima S, Mori M, Nagamatsu T, Oda K, Osuga Y, Taketani Y, Kang JX, Arai H, Arita M, Kozuma S, Fujii T, Peritoneal endometriosis is suppressed by endogenous and exogenous omega-3 polyunsaturated fatty acids, *PLOS One*, 10;8(9):e73085, 2013
- 18) Ichinose M, Fujimoto A, Osuga Y, Minaguchi T, Kawana K, Yano T, Kozuma S, The Influence of Infertility Treatment on the Prognosis of Endometrial Cancer and Atypical Complex Endometrial Hyperplasia, *Int J Gynecol Cancer*, 23: 288-293, 2013
- 19) Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Nagamatsu T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S, The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN, *Am J Reprod Immunol*, 69: 134-141, 2013
- 20) Sayama S, Nagamatsu T, Schust DJ, Itaoka N, Ichikawa M, Kawana K, Yamashita T, Kozuma S, Fujii T. Human decidual macrophages suppress IFN- γ production by T cells through costimulatory B7-H1:PD-1 signaling in early pregnancy. *J Reprod Immunol*, 100: 109-117, 2013
- 21) Pereira L, Petitt M, Fong A, Tsuge M, Tabata T, Fang-Hoover J, Maidji E, Zydek M, Zhou Y, Inoue N, Logahvi S, Pepkowitz S, Ogunyemi D. Idiopathic intrauterine growth restriction caused by cytomegalovirus infection and associated placental pathology. *J Infect Dis* In Press
- 22) Taniguchi R, Koyano S, Suzutani T, Goishi K, Ito Y, Morioka I, Oka A, Nakamura H, Yamada H, Igarashi T, Inoue N. Polymorphisms in Toll-like receptor 2 are associated with congenital cytomegalovirus infection. *Int J Infect Dis* 17(12): e1092-7, 2013
- 23) Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital

- CMV infection and their mothers. *J Clin Virol* 58: 474-478, 2013.
- 24) Kawada J, Ito Y, Torii Y, Kimura H, Iwata N. Remission of juvenile idiopathic arthritis with primary Epstein-Barr virus infection. *Rheumatol* 52:956-8 2013
 - 25) Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human herpesvirus 6-associated encephalopathy in a child with Dravet syndrome. *Neuropediatrics* 44:155-8, 2013
 - 26) Ito Y, Kawamura Y, Iwata S, Kawada J, Yoshikawa T, Kimura H. Demonstration of type II latency in T lymphocytes of Epstein-Barr Virus -associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 60: 326-328, 2013
 - 27) Esaki S, Goshima F, Kimura H, Murakami S, Nishiyama Y. Enhanced antitumoral activity of oncolytic herpes simplex virus with gemcitabine using colorectal tumor models. *Int J Cancer* 132:1592-601, 2013
 - 28) Torii Y, Kimura H, Hayashi K, Suzuki M, Kawada J, Kojima S, Katano Y, Goto H, Ito Y. Causes of vertical transmission of hepatitis B virus under the at-risk prevention strategy in Japan. *Microbiol Immunol* 57:118-21, 2013
 - 29) Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T. Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol* 87:2120-7, 2013
 - 30) Isobe Y, Hamano Y, Yoshinori Ito Y, Kimura H, Tsukada N, Sugimoto K, Komatsu N. A monoclonal expansion of Epstein-Barr virus-infected natural killer cells after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Virol* 56:150-2, 2013
 - 31) Ohta R, Imai M, Kawada J, Kimura H, Ito Y. Interleukin-17A-producing T lymphocytes in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Microbiol Immunol* 57:139-44, 2013
 - 32) Torii Y, Kimura H, Ito Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H. Clinico-epidemiological states of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 32:699-701, 2013
 - 33) Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kojima S, Kimura H, Ito Y. Plasma viral MicroRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 208: 771-9, 2013
 - 34) Sugimoto A, Sato Y, Kanda T, Murata T, Narita Y, Kawashima D, Kimura H, Tsurumi T. Different Distributions of Epstein-Barr virus early and late gene transcripts within viral replication compartments. *J Virol* 87: 6693-9, 2013
 - 35) Murata T, Iwata S, Siddiquey NA, Kanazawa T, Goshima F, Kimura H, Tsurumi T. Heat shock protein 90 inhibitors repress latent membrane protein 1 (LMP1) expression and proliferation of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lymphoma. *PLoS One* 8:e63566, 2013
 - 36) Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H. Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan. *Pediatr Int* 55,

- 566-571, 2013
- 37) Suzuki M, Torii Y, Kawada J, Kimura H, Kamei H, Onishi Y, Kaneko K, Ando H, Kiuchi T, Ito Y. Immunogenicity of inactivated seasonal influenza vaccine in adult and pediatric liver transplant recipients over two seasons. *Microbiol Immunol* 57:715-22.2013
- 38) Ito Y, Suzuki R, Torii Y, Kawa K, Kikuta A, Kojima S, Kimura H. HLA-A*26 and HLA-B*52 are associated with a risk of developing EBV-associated T/NK lymphoproliferative disease. *Blood* e-Letter ID: bloodjournal_el; 8085, 2013
- 39) Kato S, Miyata T, Takata K, Shimada S, Ito Y, Tomita A, Elsayed AA, Takahashi E, Asano N, Kinoshita T, Kimura H, Nakamura S. Epstein-Barr virus-positive cytotoxic T-cell lymphoma followed by chronic active Epstein-Barr virus infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder: a case report. *Hum Pathol* 44:2849-52, 2013
- 40) Kimura H, Kawada J, Ito Y. Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies: the expanding spectrum of hematopoietic neoplasms. *Nagoya J Med Sci* 75: 169-79, 2013
- 41) Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers. *J Clin Virol.* 58: 474-478. 2013.
- 42) Matsuo K, Morioka I, Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, Inoue N, Yamada H, Iijima K. Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev.* 36, 10-15, 2014
- 43) 森岡一朗, 山田秀人, 平久進也, 蝦名康彦, 出口雅士, 香田 翼, 飯島一誠: 母子感染が疑われる児への対応、サイトメガロウイルス抗体・トキソプラズマ抗体. *小児科診療*: 77 (3), 347-350, 2014
- 44) 山田秀人, 平久進也, 森岡一朗, 蝦名康彦: 母子感染の最近の動向 妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の一次アンケート全国調査の結果. *臨床婦人科産科*: 67 (1), 59-62, 2013
- 45) 山田秀人, 平久進也, 森岡一朗, 蝦名康彦, 出口雅士, 長又哲史: 母子感染の恐れのある感染症の情報. *助産雑誌*: 67(7), 520-525, 2013
- 46) 山田秀人, 森岡一朗, 平久進也, 谷村憲司, 出口雅士, 蝦名康彦: 我が国における多施設共同研究の現状 - サイトメガロウイルス. *周産期医学*: 43(10), 1295-1299, 2013
- 47) 山田秀人: 妊娠と感染症. 今日の治療指針 2014年版. 医学書院. 東京: 1177-1179, 2014
- 48) 山田秀人, 平久進也, 森岡一朗, 蝦名康彦: 母子感染の最近の動向 妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の一次アンケート全国調査の結果. *臨床婦人科産科*: 67 (1), 59-62, 2013
- 49) 山田秀人, 平久進也, 森岡一朗, 蝦名康彦, 出口雅士, 長又哲史: 母子感染の恐れのある感染症の情報. *助産雑誌*: 67(7), 520-525, 2013
- 50) 山田秀人, 森岡一朗, 平久進也, 谷村憲司, 出口雅士, 蝦名康彦: 我が国における多施設共同研究の現状 - サイトメガロウイルス. *周産期医学*: 43(10), 1295-1299, 2013
- 51) 山田秀人: 全国産科施設を対象とした妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の実態

- 調査．第 19 回ヘルペス感染症フォーラム，ヘルペス感染症研究会編，エムディエス・シーエムジー，東京：54-56，2013
- 52) 齋藤 滋：特集 HTLV-1 と母乳育児「HTLV-1 抗体検査の理解」．助産雑誌．2014．68：17-21．
- 53) 齋藤 滋．HTLV-1 と母子感染（解説）．第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会講演要旨．日本産科婦人科学会雑誌．2013；65：1658-1663．
- 54) 齋藤 滋．HTLV-1 母子感染対策．産婦人科の実際．2013；62：543-547．
- 55) 増崎英明：厚生労働科学研究費 25年間継続した妊婦のHTLV-1抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発．平成24年度厚生労働科学研究費 HTLV-1関連疾患研究領域研究班合同発表会 p5, 2月16日 2013
- 56) 増崎英明：母子保健のバージョンアップ「HTLV-1母子感染対策事業における保健師の役割-長崎県における取り組みを中心に」．保健師ジャーナル 69(10):795-800, 2013
- 57) 増崎英明：HTLV-1母子感染．別冊 日本臨床新領域別症候群シリーズ No.25 感染症症候群（第2版）p708-711 2013
- 58) 三浦清徳、築山尚史、増崎英明：性感染症と母子感染 -最近の診断と管理-」II．母子感染 4．11)HTLV-1, 臨床婦人科産科 2013;67 巻 1 号:152-162.
- 59) 築山尚史、三浦清徳、増崎英明:長崎県において26年間継続した妊婦のHTLV-1スクリーニング検査から得られた母子感染防止効果の検証とスクリーニングシステムの開発．九州連合産科婦人科学会誌，2013;64巻:66-69
- 60) 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：長崎県におけるHTLV-1母子感染防止の取り組み．日本産婦人科・新生児血液学会雑誌22:45-54,2013
- 61) 山下 美和，前田真，杉村基，金山 尚裕，峰松 俊夫，楠元 和美，金子 政時，池ノ上克:サイトメガロウイルス(CMV)と周産期先天性サイトメガロウイルス感染症と IgG Avidity. 日本周産期・新生児医学会雑誌 42 巻 785-788,2006
- 62) 山下 美和，金山 尚裕:サイトメガロウイルス．産科と婦人科 71 巻 Suppl.77-81, 2004.
- 63) 古谷野伸．TORCH 症候群 妊娠中の感染に気をつけて 月刊地域保険 第 44 巻第 6 号 P44-P49 2013 年
- 64) 古谷野伸．先天性サイトメガロウイルス感染症 日本の現状と対策 小児科臨床 第 66 巻増刊号 P263-P268 2013 年

2. 学会発表

- 1) Ebina Y, Sanoyama A, Tairaku S, Morioka I, Tanimura K, Morizane M, Deguchi M, Minematsu T, Inoue N, Yamada H. Diagnostic value of IgG avidity for prediction of congenital cytomegalovirus infection. 17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, June 3 to 6, 2013, Lisbon, Portugal
- 2) Kiyonori Miura, Shuhei Abe, Akira Kinoshita, Hiroyuki Mishima, Shoko Miura Koh-ichiro Yoshiura, and Hideaki Masuzaki: Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer. Proceeding of The 63th Annual meeting of American Society of Human Genetics. p247, 2013.
- 3) Naoki Fuchi, Kiyonori Miura, Takashi Tsukiyama, Daisuke Sasaki, Naoko Inokuchi, Katsunori Yanagihara, Shimeru Kamihira, Hiroyuki Moriuchi, Koichiro Yoshiura, Hideaki Masuzaki: Proviral loads of human T-cell leukemia virus type 1 in the peripheral blood samples from carrier pregnant women. Proceeding of The 63th A

- annual meeting of American Society of Human Genetics. p229, 2013.
- 4) Kazuaki Ohashi, Kiyonori Miura, Shuhei Abe, Akira Kinoshita, Shoko Miura, Daisuke Hamaguchi, Koh-ichiro Yoshiura and Hideaki Masuzaki: Initial viral load in cases of single human papillomavirus 16 or 52 persistent infection is associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix. Proceeding of The 63th Annual meeting of American Society of Human Genetics. p252, 2013.
 - 5) Kawana K, Immunotherapy for cervical neoplasia through HPV E7-specific mucosal immunity, The 51th Annual meeting of Japanese Society of Clinical Oncology (JSCO2013), Kyoto, 2013. 10. 25
 - 6) Kawana K, A novel approach: Immunotherapy for cervical intraepithelial neoplastic (CIN) lesions through HPV E7-specific mucosal immunity, The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2013.9.11
 - 7) Kawano Y, Iwata S, Kawada JI, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kimura H, Ito Y. Circulating Viral MicroRNAs Are Potential Biomarkers for Disease Status in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. The 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA , July 22, 2013
 - 8) Kawada JI, Ito Y, Iwata S, Kawano Y, Kanazawa T, Siddiquey MN, and Kimura H. mTOR inhibitors induce cell cycle arrest and inhibit tumor growth in Epstein-Barr virus-associated T and natural killer cell lymphoma. The 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA , July 22, 2013,
 - 9) Ebina Y, Sanoyama A, Tairaku S, Morioka I, Tanimura K, Morizane M, Deguchi M, Minematsu T, Inoue N, Yamada H. Diagnostic value of IgG avidity for prediction of congenital cytomegalovirus infection. 17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, June 3 to 6, 2013, Lisbon, Portugal
 - 10) Tairaku S, Ebina Y, Sonoyama A, Morioka I, Tanimura K, Morizane M, Minematsu T, Inoue N, Yamada H. Low IgG avidity and ultrasound fetal abnormality predict congenital cytomegalovirus infection. 17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, June 3 to 6, 2013, Lisbon, Portugal
 - 11) Yamashita M, Morioka I, Sonoyama A, Tairaku S, Tanimura K, Ebina Y, Iijima K, Yamada H. Awareness of and knowledge about mother-to-child infections in Japanese pregnant women. 17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, June 3 to 6, 2013, Lisbon, Portugal
 - 12) 山田秀人：サイトメガロウイルス母子感染の現状．第22回三重県生涯教育特別研修セミナー（特別講演），平成26年1月29日，津
 - 13) 山田秀人：母子感染の現況と対策．京滋奈和性感染症研究会（特別講演），平成25年12月21日，京都
 - 14) 山田秀人：サイトメガロウイルスの母子感染．第26回日本性感染症学会学術集会（招請講演），平成25年11月17日，岐阜
 - 15) 山田秀人：全国妊婦健診施設を対象とした妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の実態調査．平成25年度位育会臨床セミナー（話題提供講演），平成25年8月24日，神戸
 - 16) 山田秀人：サイトメガロウイルスの母子感染．第30回日本産婦人科感染症研究会（指定講演），平成25年6月30日，東京
 - 17) 山田秀人：母子感染の現況と対策 サイトメガロウイルス他．第55回愛媛県産婦人科医学会学術集談会（特別講演），平成25年6月22日，松山
 - 18) 山田秀人：全国妊婦健診施設を対象とした妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の実態調査．第54回日本臨床ウイルス学会（シンポジウム），6月8日，倉敷
 - 19) 蝦名康彦、平久進也、長又哲史、森上聡子、谷村憲司、出口雅士、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：母体血サイトメガロウイルス IgG avidity 測定による先天性感染の発生予知、第28回ヘルペスウイルス研究

- 会、平成 25 年 5 月 30 日-6 月 1 日、兵庫
- 20) 山田秀人：母子感染の現況と対策 サイトメガロウイルス他．第 54 回和歌山県産婦人科医会学術集会（特別講演），平成 25 年 5 月 26 日，和歌山
 - 21) 山田秀人：母子感染の現況と対策 サイトメガロウイルス他．第 256 回広島市臨床産婦人科医会研修会（特別講演），平成 25 年 5 月 23 日，広島
 - 22) 三浦清徳、築山尚史、森内浩幸、増崎英明：長崎県における出生年代別にみた妊婦 HTLV-1 キャリアの比較検討．第 49 回日本周産期新生児医学会
 - 23) 三浦清徳、築山尚史、猪口直子、佐々木大介、上平 憲、柳原克紀、森内浩幸、吉浦孝一郎、増崎英明：HTLV-1 キャリア妊婦から出生した児における臍帯血中の HTLV-1 抗体価およびプロウイルス量に関する検討．第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム
 - 24) 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：HTLV-1 キャリア妊婦から出生した児における臍帯血中の HTLV-1 抗体価およびプロウイルス量に関する検討．第 3 6 回母体胎児医学会
 - 25) 築山尚史、三浦清徳、佐々木大介、猪口直子、土井裕子、長谷川寛雄、柳原克紀、上平憲、森内浩幸、吉浦孝一郎、増崎英明：妊婦 HTLV-1 スクリーニングシステムにおけるリアルタイム PCR 検査の有用性に関する検討．第 65 回日本産婦人科学会学術講演会
 - 26) 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：妊婦 HTLV-1 スクリーニングシステムにおけるリアルタイム PCR 検査の有用性に関する検討．第 70 回九州連合産科婦人科学会
 - 27) 築山尚史、三浦清徳、森内浩幸、増崎英明：HTLV-1 キャリアの妊婦における倫理的問題点とその対応．第 49 回日本周産期新生児医学会
 - 28) 淵直樹、築山尚史、吉田敦、三浦清徳、増崎英明：妊娠と分娩後における HTLV-1 プロウイルス量の推移に関する検討．第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム
 - 29) 川名 敬、HPV 感染症を見直すー基礎から臨床までー、日本性感染症学会教育講演、11 月、岐阜
 - 30) 井上知子、川名 敬、田口歩、大須賀穰、藤井知行、CIN 治療を目的とした E7 発現型乳酸菌 HPV 経口ワクチンによる E7 特異的粘膜免疫誘導能は合成セラミド β -GalCer と漢方薬併用経口投与により増強する。日本産科婦人科学会第 65 回学術講演会 2013 年 5 月
 - 31) 井上直樹 基礎研究者からみた先天性 CMV 感染対策：検査法とワクチン開発の現状と方向性 シンポジウム「母子感染」第 45 回日本小児感染症学会学術集会 札幌 2013 年 10 月 26-27 日
 - 32) 谷口留美、古谷野伸、錫谷達夫、五石圭司、伊藤裕司、森岡一朗、中村浩幸、山田秀人、岡明、井上直樹 NK 細胞の標的細胞認識に関わる遺伝子多型と先天性 CMV 感染症の相関 第 45 回日本小児感染症学会学術集会 札幌 2013 年 10 月 26-27 日
 - 33) 生田和史、峰松俊夫、井上直樹、久保隆彦、浅野仁覚、石橋 啓、今村 孝、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、藤原成悦、古谷野伸、錫谷達夫：先天性サイトメガロウイルス感染におけるウイルス型の解析．第 439 回福島医学会学術研究集会 福島 2013.5.23
 - 34) 生田和史、峰松俊夫、石岡 賢、佐藤友香、石橋 啓、浅野仁覚、今村 孝、藤原成悦、久保隆彦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫：先天性サイトメガロウイルス感染におけるウイルス血清型・DNA 型の解析 第 67 回日本細菌学会東北支部総会 仙台 2013.8.30-31
 - 35) 生田和史、峰松俊夫、石岡 賢、佐藤友香、石橋 啓、今村 孝、藤原成悦、久保隆彦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫 サイトメガロウイルス血清型・DNA 型に基づく先天感染例の検討 第 6 1 回日本ウイルス学会 神戸 2013.11.10-12
 - 36) 木村 宏。「母子感染」-単純ヘルペスウイルス。第 20 回ヘルペス感染症フォーラム。札幌。2013 年 8 月 23 日
 - 37) 古谷野伸、森 泰宏、山田秀人：先天性サイトメガロウイルス感染予防のための未感染妊婦に対する啓発介入の試み．第 49 回日本周産期・新生児医学会、平成 25 年 7 月 14-16 日、横浜
 - 38) 森岡一朗、黒川大輔、藤田花織、長坂美和子、香田 翼、松尾希世美、横田知之、柴田暁男、山田秀人、飯島一誠：先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症の診断における CMV 感染関連血液検査値に関する検討、第 58 回日本未熟児新生児学会、平成 25 年 11 月 30 日-12 月 1 日、金沢
 - 39) 森岡一朗：「母子感染～それぞれの立場から見えてくる問題点～」新生児科医が為すべきこと（シンポジウム）、第 45 回日本小児感染症学会、平成 25 年 10 月 26-27 日、札幌
 - 40) 橋村裕也、西田明弘、山中 巧、原田敦子、

- 林 振作、山崎麻美、森岡一朗、南 宏尚：生後 4 か月時に急速な頭囲拡大で発見された先天性サイトメガロウイルス感染症の 1 症例、第 45 回日本小児感染症学会、平成 25 年 10 月 26-27 日、札幌
- 41) 森岡一朗：周産期感染症：インフルエンザウイルスとサイトメガロウイルスに関する最近の知見（特別講演）、第 39 回和歌山周産期医学研究会、平成 25 年 9 月 7 日、和歌山
- 42) 平久進也、蝦名康彦、長又哲史、園山綾子、谷村憲司、森岡一朗、峰松俊夫、山田秀人：効果的な妊婦 CMV スクリーニング法の確立を目指して、第 49 回日本周産期新生児医学会、平成 25 年 7 月 14-16 日、横浜
- 43) 蝦名康彦、平久進也、長又哲史、森上聡子、谷村憲司、出口雅士、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：母体血サイトメガロウイルス IgG avidity 測定による先天性感染の発生予知、第 28 回ヘルペスウイルス研究会、平成 25 年 5 月 30 日-6 月 1 日、淡路
- 44) 平久進也、谷村憲司、園山綾子、上中美月、長又哲史、山下萌、篠崎奈々絵、松岡正造、蝦名康彦、森岡一朗、山田秀人：全国妊婦健診施設を対象とした妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の実態調査、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌
- 45) 長又哲史、蝦名康彦、平久進也、谷村憲司、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：効果的な妊婦 CMV スクリーニング法の確立を目指して、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌
- 46) 谷村憲司、森岡一朗、園山綾子、平久進也、蝦名康彦、森實真由美、山田秀人：免疫グロブリンを用いた先天性サイトメガロウイルス感染に対する胎児感染予防と治療、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌
- 47) 森上聡子、蝦名康彦、平久進也、谷村憲司、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：母体血サイトメガロウイルス IgG avidity 測定による先天性感染の発生予知、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌
- 48) 足立陽子、園山綾子、平久進也、谷村憲司、蝦名康彦、森岡一朗、山田秀人：母子感染に関する妊婦の知識調査、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌
- 49) 森岡一朗、谷村憲司、平久進也、園山綾子、蝦名康彦、山田秀人：先天性サイトメガロウイルス感染症に対するバルガンシクロビル療法の効果と副作用、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌
- 50) 山名啓司、藤村順也、多田慎吾、萩原優子、中川温子、沖田 空、湊川 誠、森沢 猛、米谷昌彦、森岡一朗：一過性骨髄異常増殖症への化学療法後に後天性 CMV 感染を発症した 21 トリソミーの一例、第 116 回日本小児科学会、平成 25 年 4 月 19-21 日、広島

H . 知的財産権の出願・登録状況

特になし

サイトメガロウイルス母子感染対策のための妊婦スクリーニングにおける CMV IgG Avidity Index の有用性の検討

研究分担者 山田 秀人 神戸大学大学院医学研究科 外科系講座 産科婦人科学 教授
研究協力者 出口 雅士 神戸大学医学部附属病院 周産母子センター 産科 講師

【研究要旨】

妊婦の CMV IgG Avidity Index (AI) 値で、先天性 CMV 感染の発生を予知可能か検討するため、前方視的コホート研究として、CMV IgG 陽性の妊婦 759 人を対象に CMV IgG AI を測定し、全例で新生児尿 CMV DNA を検査した。基準値を設定し、先天性 CMV 感染に対する AI の感度、特異度を調べた。その結果、先天性感染 14 人の AI 中央値 35.1%は、非感染 745 人の 70.4%より有意に低値であった。ROC 解析から AI <40%を基準値とした。妊娠 28 週未満で、感度 (88.9%) は最高となり、特異度 96.2%、陰性的中率 99.8%、陽性的中率 27.6%であった。この結果より、妊娠中、特に 28 週未満で CMV IgG AI <40%の場合、先天性 CMV 感染発生の可能性が高くなることが判明した。

A . 研究目的

Revello and Gerna は 2002 年にサイトメガロウイルス (以下 CMV) の先天性感染は、ウイルス母子感染としては最も頻度が高いと報告している。日本人妊娠女性に於ける CMV IgG 陽性率は 1988 年には 85%であったが、生活習慣の変化に伴い 2000 年には 68 %まで低下しており、平成 20 年～24 年度 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業報告によると日本人 23,400 人の新生児尿スクリーニングでは CMV 先天性感染が新生児 300 人に 1 人、症候性感染児は 1,000 人に 1 人とされている。

CMV 先天性感染児の 10～15%が出生時に胎児発育不全、低出生体重、中枢神経症状や肝障害を含む多臓器障害といった症状を呈し、新生児死亡の原因となることもしばしばである。また、死亡に至らなかった症候性 CMV 先天性感染児の 90%に重大な神経学的後遺症を残すとされている。

さらに、出生時に無症候性であった児においても 10～15%の症例で難聴・精神発達遅滞等の遅発性障害がみられる。

症候性先天性感染の多くは慢性感染や再感染症例ではなく妊娠中に初感染を生じた妊婦において成立すると考えられており、妊娠中の初感染例を効果的に診断することは非常に重要である。現在広く用いられている CMV IgM 抗体検査では、陽性は急性または直近の感染を示すと考えられているが、CMV は持続感染するウイルスであり IgM 陽性が必ずしも初感染とは関連しない。つまり、潜伏感染や回帰感染を繰り返すことで、初感染に限らず、IgM 抗体が検出されることがある。

近年、海外において CMV IgG Avidity Index (AI) が直近の初感染の診断に有効との報告がなされている。CMV IgG avidity とは CMV IgG 抗体と抗原との結合力の総和をいい、感染初期には抗原と低親和性の抗体が産生され、IgG 抗体の

avidity は低値であるが、時間経過に伴い、より親和性の高い抗体が産生され、Avidity が上昇し、その後 長期にわたって高い IgG avidity が維持される。CMV IgG AI とは全ての CMV IgG 抗体のうち高親和性 IgG 抗体の割合を示すもので、AI は感染初期には低く、時間経過に伴い上昇し、高値が維持されるものである。

我々は母体血 CMV IgG AI 測定が、CMV 先天性感染の発生予知に有用かを調べ、さらに AI の適切なカットオフポイントを設定することを目的とし、前方視的コホート研究を実施した。

B . 研究方法

1) 臨床検体・新生児検査

神戸大学医学研究科倫理委員会の承認と同意のもとで、2009 年 4 月より 2013 年 1 月までの間に、神戸大学病院に通院している妊婦については妊娠 16～18 週時点で、紹介初診患者については初診時に母体血清 CMV IgG を測定し、IgG 陽性例には AI の測定を実施した。また、先天性感染の有無を判断するため、全ての出生新生児の生後 1 週間以内の尿検体を用いて CMV-DNA 検査(PCR 法)を実施した。

新生児尿検査で CMV-DNA が陽性となった児については、症候性感染か否かを判断するために眼底検査、頭蓋内超音波断層像検査、理学検査、神経学的検査を実施し、必要があれば頭部 MRI 検査や CT 検査も実施した。先天性感染の重要な合併症として知られる感音性難聴の除外のため聴性脳幹反応検査も実施した。

2) CMV IgG と AI の測定

母体血清 CMV IgG と AI の測定は Siemens Healthcare Diagnostics 社(東京)の EIA アッセイキットを用い、愛泉会日南病院で実施した。各血清について通常の CMV IgG 測定(総抗体量)と固相化抗原に抗体

を結合させた後に尿素洗浄処理を行い、残った CMV IgG を測定(高親和性抗体量)し、総抗体量中の高親和性抗体量を比率(%)で表したものを AI とした〔AI=(高親和性抗体量÷総抗体量)×100(%)〕。

3) 新生児 CMV PCR 検査

出生後の児の CMV スクリーニング検査には尿濾紙検体を用いた。神戸大学検査部において濾紙サンプルから尿を溶出し、尿中の DNA を精製したうえで、これを鋳型として PCR を行い、CMV-DNA 発現を調べた。

4) 統計解析

CMV 先天性感染が確認された群と確認されなかった群の間で CMV IgG AI 値を比較、受信者動作特性曲線(ROC 曲線)を作成して CMV 先天性感染を診断するうえで最適なカットオフ値を求めた。統計計算ソフトは Statistica (StatSoft, OK, USA) を使用し、2 群間の比較にはマン・ホイットニーの U テストによる両側検定を利用、P 値 0.05 未満を有意とした。

(倫理面の配慮)

本研究は、神戸大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を受けて行われた。研究の目的をよく説明し、妊婦および新生児の保護者の書面での同意に基づき検体を採取し、検体をコード番号化することで連結可能匿名化を図り、適切に行われた。

C . 研究結果

930 人の妊婦が本研究の対象となり、うち 331 人については紹介時期などの関係で妊娠 18 週以降に血清 CMV IgG 検査を実施した。930 人中 759 人(83.1%)が CMV IgG 陽性で、その中から 14 件(1.8%)において新生児尿検査で先天性 CMV 感染が確

認められた。745 件 (98.2%) においては新生児尿検査で CMV DNA が確認されず、先天性 CMV 感染は否定された。

図 1 に 759 人の CMV IgG AI の測定値と測定週数の分布、先天性感染の有無を示す。先天性 CMV 感染群の CMV IgG AI 値の範囲は 2.3~77.8% で、中央値は 35.1% と、非感染群の中央値 70.4% (7.6~97.3%) に比べて有意に低値であった ($p < 0.0001$)。14 人の先天性 CMV 感染児のうち 5 人は無症候性であったが、残る 9 人は症候性感染であった。症候性感染の症状は重複ありで

肝脾腫	4 例
頭蓋内石灰化	3 例
脳室拡大	3 例
胎児発育不全	3 例
血小板減少	2 例
網膜炎	2 例
小頭症	1 例
胎児腹水	1 例

であった。

ROC 曲線による解析

CMV IgG AI 値を先天性 CMV 感染の予測に用いた場合の感度を縦軸に、1-特異度を横軸にとって ROC 曲線を作成すると、area under the curve (AUC) は 0.802 となり、十分に高い値と考えられた。(図 2)。ROC 解析では最も効果的に先天性 CMV 感染を予測出来るのは CMV IgG AI のカットオフ値を 40% とした場合で、その際の特異度は 96.1%、感度は 64.3% であった。

CMV IgG AI のカットオフ値を 40% として AI 測定時期が妊娠 26 週未満 ($n=527$)、28 週未満 ($n=565$)、30 週未満、($n=607$)、32 週未満 ($n=663$) の各群での先天性 CMV 感染の診断感度を確認したところ、妊娠 26 週未満 83.3%、28 週未満 88.9%、30 週未満 80.0%、32 週未満 72.7% となった。最も感度が高くなるのは妊娠 28 週未満に AI

を測定した群で、その際の特異度は 96.2%、陽性的中率 27.6%、陰性的中率 99.8% となり、正診率は 96.1% となった。

D. 考察

今回の前方視的コホート研究では CMV IgG 陽性妊婦 759 例中 14 例 (1.8%) において先天性 CMV 感染が認められた。今回の研究で確認された 1.8% という頻度は、疫学的な先天性 CMV 感染の発生頻度より高いが、これは母体の CMV 感染が疑われて紹介されてきた妊婦が含まれる集団を対象にした研究であることが原因として考えられる。先天性 CMV 感染群の CMV IgG AI の中央値は 35.1% と、非感染群の中央値 70.4% に比べて有意に低値であり、CMV IgG AI が低値である妊婦は、先天性 CMV 感染のハイリスク群であると言える。血清 CMV IgG AI 値が 20%、30%、40% 未満の妊婦における先天性 CMV 感染発生率はそれぞれ 50.0%、30.0%、23.7% であった。ROC 曲線解析にて最も効果的に先天性 CMV 感染を予測出来るのは CMV IgG AI のカットオフ値を 40% とした場合で、その際の特異度は 96.1%、感度は 64.3% であった。特に、妊娠 28 週未満に限定して CMV IgG AI のカットオフ値を 40% とすると感度、特異度も最大となり、陽性的中率 27.6%、陰性的中率 99.8% となり、正診率は 96.1% が得られることから、妊娠第 1 および第 2 三半期において CMV IgG AI が 40% 未満と低値であった妊婦では先天性 CMV 感染の発生リスクが高くなるものと考えられた。

Grandeot-Keros らは IgG の陽転化を確認した CMV 感染例において、最後の IgG 陰性が確認された時点から 14 週未満の CMV IgG AI の平均値は 30% (8~58%) で、大部分は 50% 未満であると報告している。また、過去 3 ヶ月以内に CMV 初感染を起こした妊婦の CMV IgG AI は通常 50% 未満とする報告もある。また最近の報告では

IgG AI 20%未満は 12 週間以内、40%未満は 20 週間以内の CMV 感染を示唆するとされている。しかし、これまで CMV IgG AI と先天性 CMV 感染の関連について前方視的に検討された報告はなかった。今回の前方視的コホート研究で初めて CMV IgG AI 40%をカットオフ値とすることで、最も効率的に先天性 CMV 感染を予測することが出来ることを見出した。

ただ、CMV IgG AI の測定は理論的には CMV の再活性化や回帰感染による先天性 CMV 感染の予測には有効でないものと考えられる。今回の検討では CMV IgG AI 40%以上で先天性 CMV 感染が確認された 5 例中 4 例で、AI 測定が妊娠 28 週以降に行われていた。おそらく IgG AI が妊娠後期に行われた場合の先天性 CMV 感染予測感度は極端に低下するものと思われた。

この結果は CMV IgG AI 測定が先天性 CMV 感染の予測を行ううえで、臨床的に非常に有効であることを示しているが、CMV IgG AI の測定値については使用する検査キット、検査機関によって大きく異なる可能性があるため、直ちに CMV IgG AI 40%をカットオフ値とすることが全ての医療機関に推奨されるものではないと考えられ、検査の標準化が待たれる。また、今回の検討では先天性 CMV 感染例は 14 例しかなく、CMV IgG AI の測定時期も幅広く分布しているため、十分な症例数に基づく結果と言えない可能性があり、今後 CMV IgG AI 測定時期をより限定したうえで、症例の集積を継続する予定である。

E . 結論

1. 前方視的コホート研究により CMV IgG AI 測定が先天性 CMV 感染の予測を行ううえで、臨床的に非常に有効であることを示すことができた。
2. 我々の測定系では妊娠 28 週未満で

CMV IgG AI 40%をカットオフ値とすることが、妊婦の妊娠中の初感染や先天性 CMV 感染を予測するうえで最も有用と考えられた。

3. 妊娠末期になってからの CMV IgG AI 測定では、先天性 CMV 感染の発生を予測することは困難であると考えられた。
4. CMV IgG AI の測定法の標準化は重要な課題であると考えられた。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ebina Y, Minematsu T, Sonoyama A, Morioka I, Inoue N, Tairaku S, Nagamata S, Tanimura K, Morizane M, Deguchi M, Yamada H. The IgG avidity value for the prediction of congenital cytomegalovirus infection in a prospective cohort study. *J Perinat Med*. In press, 2014
- 2) Morioka I, Sonoyama A, Tairaku S, Ebina Y, Nagamata T, Morizane M, Tanimura K, Iijima K, Yamada H. Awareness of and knowledge about mother-to-child infections in Japanese pregnant women. *Congenit Anom*, 54, 35-40, 2014
- 3) Yamada H, Tairaku S, Morioka I, Ebina Y, Sonoyama A, Tanimura K, Deguchi M, Nagamata S. A nationwide survey of maternal screening for mother-to-child infections in Japan. *Congenit Anom*. doi:10.1111/cga.12044, 2013
- 4) 山田秀人：妊娠と感染症．今日の治

療指針 2014 年版．医学書院．東京：
1177-1179, 2014

平成 26 年 1 月 29 日，津

- 5) 山田秀人，平久進也，森岡一朗，蝦名康彦：母子感染の最近の動向 妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の一次アンケート全国調査の結果．臨床婦人科産科：67(1)，59-62, 2013
- 6) 山田秀人，平久進也，森岡一朗，蝦名康彦，出口雅士，長又哲史：母子感染の恐れのある感染症の情報．助産雑誌：67(7)，520-525, 2013
- 7) 山田秀人，森岡一朗，平久進也，谷村憲司，出口雅士，蝦名康彦：我が国における多施設共同研究の現状 - サイトメガロウイルス．周産期医学：43(10)，1295-1299, 2013
- 8) 山田秀人：全国産科施設を対象とした妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の実態調査．第 19 回ヘルペス感染症フォーラム，ヘルペス感染症研究会編，エムディエス・シーエムジー，東京：54-56, 2013

- 3) 山田秀人：母子感染の現況と対策．京滋奈和性感染症研究会(特別講演)，平成 25 年 12 月 21 日，京都
- 4) 山田秀人：サイトメガロウイルスの母子感染．第 26 回日本性感染症学会学術集会(招請講演)，平成 25 年 11 月 17 日，岐阜
- 5) 山田秀人：全国妊婦健診施設を対象とした妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の実態調査．平成 25 年度位育会臨床セミナー(話題提供講演)，平成 25 年 8 月 24 日，神戸
- 6) 山田秀人：サイトメガロウイルスの母子感染．第 30 回日本産婦人科感染症研究会(指定講演)，平成 25 年 6 月 30 日，東京
- 7) 山田秀人：母子感染の現況と対策 サイトメガロウイルス他．第 55 回愛媛県産婦人科医会学術集談会(特別講演)，平成 25 年 6 月 22 日，松山

2.学会発表

- 1) Ebina Y, Sanoyama A, Tairaku S, Morioka I, Tanimura K, Morizane M, Deguchi M, Minematsu T, Inoue N, Yamada H. Diagnostic value of IgG avidity for prediction of congenital cytomegalovirus infection. 17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, June 3 to 6, 2013, Lisbon, Portugal
- 2) 山田秀人：サイトメガロウイルス母子感染の現況．第 22 回三重県生涯教育特別研修セミナー(特別講演)，

- 8) 山田秀人：全国妊婦健診施設を対象とした妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の実態調査．第 54 回日本臨床ウイルス学会(シンポジウム)，6 月 8 日，倉敷
- 9) 蝦名康彦、平久進也、長又哲史、森上聡子、谷村憲司、出口雅士、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：母体血サイトメガロウイルス IgG avidity 測定による先天性感染の発生予知、第 28 回ヘルペスウイルス研究会、平成 25 年 5 月 30 日-6

月 1 日、兵庫

10) 山田秀人：母子感染の現況と対策
サイトメガロウイルス他．第 54 回
和歌山県産婦人科医会学術集会（特
別講演），平成 25 年 5 月 26 日，和
歌山

11) 山田秀人：母子感染の現況と対策
サイトメガロウイルス他．第 256 回
広島市臨床産婦人科医会研修会（特
別講演），平成 25 年 5 月 23 日，広
島

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1

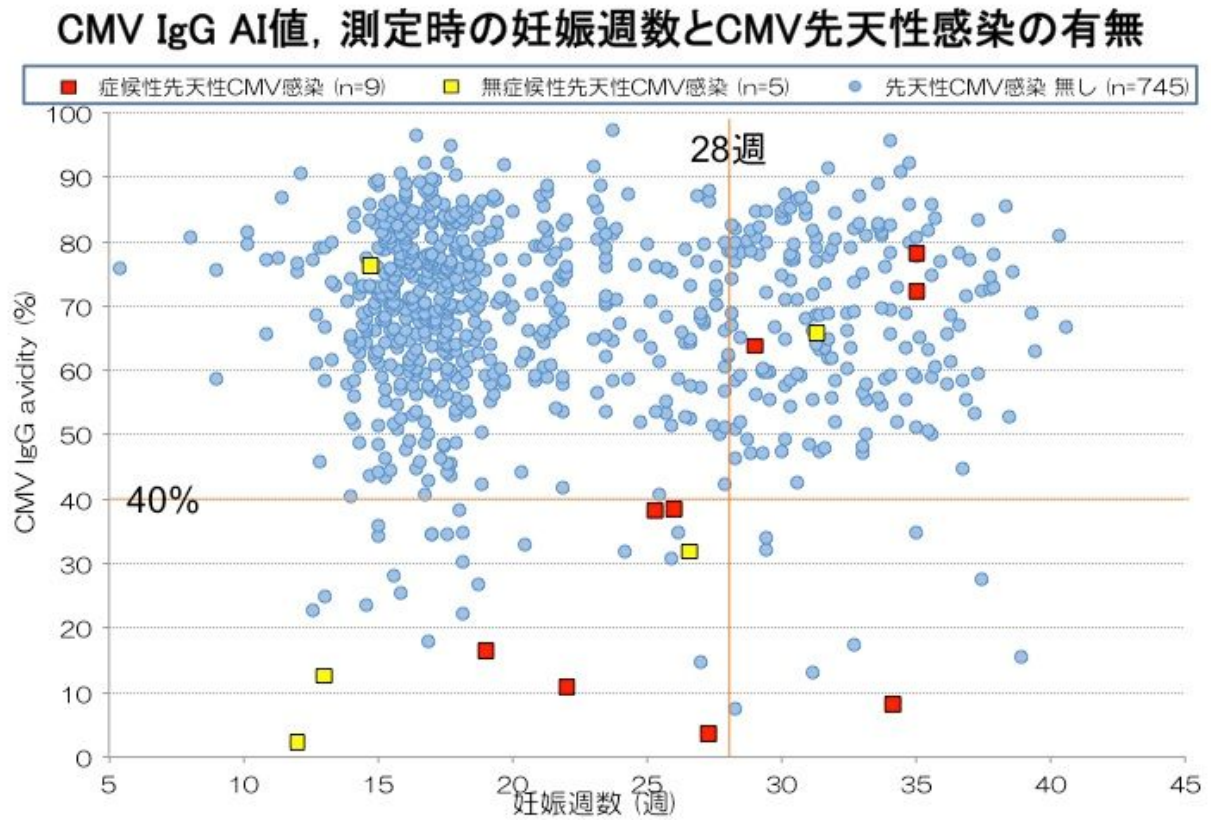
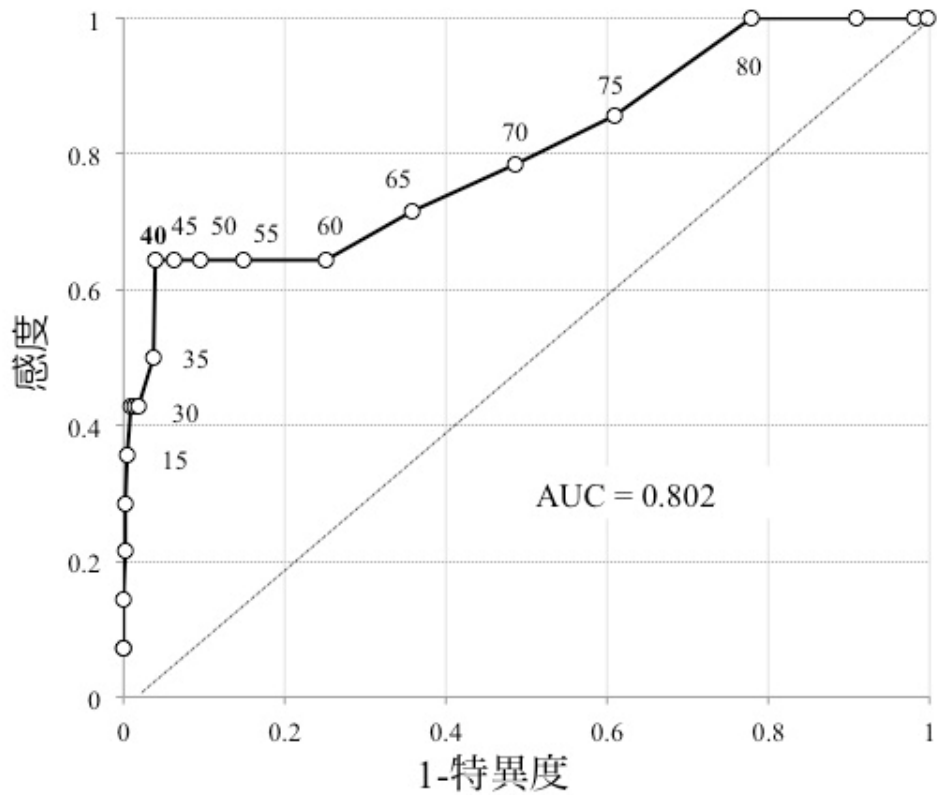


図 2



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morioka I, Sonoyama A, Tairaku S, Ebina Y, Nagamata T, Morizane M, Tanimura K, Iijima K, Yamada H.	Awareness of and knowledge about mother-to-child infections in Japanese pregnant women.	<i>Congenit Anom</i> , 54, 35-40, 2014	54	35-40	2014
Matsuo K, Morioka I, Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, Inoue N, Sugimura K, Yamada H, Iijima K.	Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection.	<i>Brain & Dev</i>	36	10-15	2014
Yamada H, Tairaku S, Morioka I, Ebina Y, Sonoyama A, Tanimura K, Deguchi M, Nagamata S.	A nationwide survey of maternal screening for mother-to-child infections in Japan.	<i>Congenit Anom.</i> doi:10.1111/cga.12044, 2013		doi:10.1111/cga.12044,2013	2014

題名 富山大学産科婦人科におけるサイトメガロウイルスIgM陽性例ならびに
トキソプラズマIgM陽性例に対するAvidity検査

研究分担者 齋藤 滋 富山大学大学院医学薬学研究部産科婦人科 教授

研究要旨：

サイトメガロウイルス（CMV）の感染既往のない妊婦が30%以上に増加しており、これらのCMV-IgG抗体陰性妊婦から出生した児の300人に1人にCMV母子感染が生じているという報告もある。そこで、妊娠初期にCMV-IgG抗体、IgM抗体を測定し、IgM抗体陽性、IgG抗体陽性例の8例に対してAvidity検査を行なった。1例にAvidity検査が30.1%と初感染の可能性が高い症例が認められた。トキソプラズマ抗体価がPHA法で20,480倍であったため、トキソプラズマ抗体価を測定したところ、IgG 73、IgM 1.8と共に陽性であったため、Avidity検査を行ない、現在結果待ちの状態にある。

A．研究目的

サイトメガロウイルス（CMV）母子感染ならびにトキソプラズマ母子感染は大きな問題となっている。そのため、本研究班ではCMV-IgM抗体陽性、トキソプラズマIgM抗体陽性例に対して、Avidity検査を行ない、初感染、再感染を推定し、出生後に確認するシステムを構築した。今回は富山大学における現状を報告する。

B．研究方法

2013年9月～2014年2月の約6ヶ月の間に妊婦健診を受けた妊婦に対して、感染スクリーニング検査としてCMV-IgG、CMV-IgM、トキソプラズマ抗体（PHA法）異常高値例に対してトキソプラズマIgG、トキソプラズマIgM抗体価を計測し、CMV-IgG陽性者、トキソプラズマIgM抗体陽性者にAvidity検査を行なった。なお、精密検査する際、研究の目的を説明し、文書で同意を得た。CMV Avidity検査は愛泉会日南病院 峰松俊夫先生に送付し、トキソプラズマAvidity検査は東京大学に郵送した。本研究は、富山大学倫理委員会の承認を得ており、全例に文書で同意を得た。

C．研究結果

表1に示す如く、妊娠初期にCMV抗体価を測定したうち、7例にCMV-IgM抗体陽性例が存在した。そのためAvidity検査を行なったところ、7例すべてがAvidity Indexが40%以上であり、既感染の可能性が高いと診断された。一方、妊娠28週に脳室拡大を指摘された症例（表1のcase No.8）では、Avidity Indexが30.1%と低値であり、初感染が疑われた。このため出生後に新生児尿を採取し、PCR法にてCMV感染の有無を検討することを予定している。

この期間中、妊娠初期のトキソプラズマ抗体価がPHA法で20,480倍と高値であったため、トキソプラズマIgG抗体、IgM抗体を測定したところ、IgG 73と高値、IgMも1.8と高値であった。このため、Avidity検

査を依頼した。なお、ネコは飼っておらず、妊娠中の生肉の摂取もなかった。

表1. CMV Avidity検査（富山大学）

Case No.	妊娠週数	CMV-IgG	CMV-IgM	再検時 CMV-IgG	再検時 CMV-IgM	Avidity Index
1	8W	24	1.37	—	—	69.1%
2	7W	4	3.25	5	2.34	52.7%
3	7W	29	0.91	32	1.8	54.1%
4	8W	12	3.17	14	2.09	62.2%
5	9W	13	2.1	—	—	60.9%
6	7W	9	2.93	15	3.73	57.3%
7	6W	44	0.8	36.9	<0.8	71.0%
8*	32W	6.8	2.76	—	—	30.1%

* 胎児脳室拡大、髄膜瘤を認めた

D．考察

現在、CMV抗体価を妊娠初期に定期的に測定している施設は少ないが、IgM陽性となるケースが予想以上に多いことが判った。そのためAvidity検査を行なったところ、1例が初感染の疑いであった。まだ、出生していないので、出生後に直ちに尿のPCR検査を行ない、陽性であれば小児科にて治療を行なう予定である。なお、同症例では、胎児脳室拡大もあり、先天性CMV感染の可能性が高いと考えられた。富山大学では年間約300例の分娩を取り扱っているため、これらの症例は、約150症例あたりということになる。150症例あたり8名の妊婦（5.3%に相当）で、CMV-Avidity検査を必要とした。このように判断に困る症例が予想以上に多いことが判った。

E．結論

妊娠初期にCMV抗体検査を施行すると、約5%にAvidity検査が必要であることが判明した。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito S, Minakami H, Nakai A, Unno N, Kubo T, Yoshimura Y. Outcomes of infants exposed to oseltamivir or zanamivir in utero during pandemic (H1N1) 2009. Am J Obstet Gynecol. 2013 ;209:130.e1-9.
- 2) Yoneda N, Shiozaki A, Miura K, Yonezawa R, Takemura K, Yoneda S, Masuzaki H, Saito S. A triploid partial mole placenta from paternal isodisomy with a diploid fetus derived from one sperm and one oocyte may have caused angiogenic imbalance leading to preeclampsia-like symptoms at 19 weeks of gestation. Placenta. 2013;34:631-634.
- 3) Inada K, Shima T, Nakashima A, Aoki K, Ito M, Saito S. Characterization of regulatory T cells in decidua of miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content. J Reprod Immunol. 2013; 97:104-111.
- 4) Nakashima A, Yamanaka-Tatematsu M, Fujita N, Koizumi K, Shima T, Yoshida T, Nikaido T, Okamoto A, Yoshimori T, Saito S. Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia. Autophagy. 2013; 9:303-316.
- 5) Saito S, Shima T., Inada K., Nakashima A. Which Types of Regulatory T cells Play Important Roles in Implantation and Pregnancy Maintenance? Am J Reprod Immunol. 2013 ;69:340-345.
- 6) Saito S, Nakashima A. Review: The role of autophagy in extravillous trophoblast function under hypoxia. Placenta,2013; 27:S79-S84
- 7) Shiozaki A, Matsuda Y, Satoh S, Saito S. Comparison of risk factors for gestational hypertension and preeclampsia in Japanese singleton pregnancies. J.Obstet Gynecol Res. 2013; 39:492-499.
- 8) 齋藤 滋 : 特集 HTLV-1と母乳育児「HTLV-1抗体検査の理解」. 助産雑誌. 2014. 68: 17-21.
- 9) 齋藤 滋. HTLV-Iと母子感染 (解説) .第65回日本産科婦人科学会学術講演会講演要旨. 日本産科婦人科学会雑誌. 2013; 65: 1658-1663.
- 10) 齋藤 滋. HTLV-I母子感染対策. 産婦人科の実

厚生労働科学研究費補助金（育成疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
研究分担報告書

母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究（多施設共同研究）

研究分担者 鮫島 浩 宮崎大学医学部生殖発達医学講座産婦人科分野 教授
研究協力者 金子政時 宮崎大学医学部生殖発達医学講座産婦人科分野 准教授
川越靖之 宮崎大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター 講師

研究要旨

妊婦のウイルスや原虫の感染は胎盤を通じて胎児へと移行することがあり、児にTORCH症候群（トキソプラズマ、風疹、サイトメガロウイルス、ヘルペスの母子感染により発症する小児先天性疾患の総称；Toxoplasma, Rubella, cytomegalovirus, herpes症候群）等の様な重篤な全身感染症を来す。母子感染による後遺症としては中枢神経系、聴覚系、視覚系など多岐に渡るが、こうした後遺症は早期介入、治療により予後改善が可能であることが示されてきており、今後、予防、診断、治療の包括的な母子感染医療体制の構築が求められている。母子感染には研究レベルで新たな診断や治療技術が開発されてきているが、臨床医療技術としては未だ導入されておらず、医療現場での混乱を来している。

特に頻度の高いサイトメガロウイルスについては、厚生労働科学研究として行われた新生児スクリーニング調査によって、我が国で現在300人に1人という高い率で発生していることが分かった¹⁾。しかし妊婦血清のAvidity検査（アビディティ検査、抗体結合能検査）は妊娠中の感染が初感染かどうかを診断する基準となる検査であるが我が国では未承認となっている。また、先天性CMV感染症の治療は難聴などの症候性の児に対する抗ウイルス治療の治験は海外において積極的に行われ、我が国でも施設単位での投与が試みられているがその実態は不明である。一方、トキソプラズマ感染の頻度はより低いものの、その実態は不明である。すでに海外では薬剤による治療が一般化しているが、国内での販売がなく未解決となっている。さらにサイトメガロウイルスと同様、我が国の妊婦での血清学的な先天感染のハイリスク診断技術であるAvidity検査は未承認であり、測定方法により診断基準にばらつきが認められる。こうした現状の問題点解決のために、厚生労働省班研究による多施設共同研究（研究全体責任者：藤井知之、研究総括施設：東京大学医学部附属病院女性診療科・産科）（資料1）が実施されることになった。この研究の一部を当施設が担当する。

まず、本研究では、東京大学を中心にサイトメガロウイルスとトキソプラズマの母子感染についての包括的な医療体制の基盤となる医療技術の開発を行う。母子感染リスク評価法と新生児フォロー体制を確立するために妊婦での血清学的なハイリスク診断であるAvidity検査法の有用性を検証し、複数の医療機関が共同で研究を行い我が国における診断基準の標準化を目指し診断方法の開発を行う。また感染児の診断法についてもCMVの尿DNA診断の確立を目指す。さらに先天感染の実態把握の強化と基盤情報を集積しエビデンスに基づく将来の治療を可能とするために、感染児のレジストリ制度を構築し、治療等について国内の施設間で協力し相談が可能な体制作りを行う。

こうした母子感染の新規の技術を組み入れた包括的医療体制は海外で確立しておらず、新規技術のイノベーションとして技術の標準化や有効性の検証などを先駆けて行うものであり、少子化の中でも安心して子供を出産できる施策の一翼を担うことができると考える。

A. 研究目的

本研究ではサイトメガロウイルス(CMV)とトキソプラズマの母子感染についての包括的な医療体制の基盤となる医療技術の開発を行い、母子感染のリスク評価法とフォロー体制の確立を目的とする。

B. 研究方法

(1) 研究の種類・デザイン

外来妊婦を対象にサイトメガロウイルス、トキソプラズマの前向き研究を行い先天感染と診断、あるいは可能性が非常に高い児のレジストリを行い成長発達、合併症などについて経過観察する。

(2) 試験のアウトライン

本研究は東京大学を中心とした多施設共同研究である。そのうち、当施設では下記分野において共同研究を分担する。当院で採取した検体は検査施設が複数記載されている場合、検体を分注し検査施設に送付し、適宜検査、測定を行う(中央検査体制)。複数の施設で測定を行うことで診断基準の標準化を行う。

1. 研究の概要

CMVのAvidity検査開発

* 後ろ向き研究

先天性CMV感染は頻度の少ない疾患であり、検査法の開発に十分な例数を確保することが困難である。当施設で以前、妊婦の感染が診断され日南病院に保存検体(血液)を用いてAvidity検査を行う(研究行為)。検体は連結可能匿名化の後、日南病院・福島医科大学・東京大学女性診療科・産科、神戸大学産婦人科、共同研究企業に送付され、共同研究に参加希望する各メーカーの検査法・検査キットの検定比較・統計解析を行い、Avidity検査の標準化を行うとともに、臨床的有用性などの評価を行う。血清は、

日南病院・福島医科大学・東京大学女性診療科・産科、神戸大学産婦人科では研究終了までは保存されるが、共同研究企業では検査終了後は破棄する。

* 前向き研究

当施設で妊娠初期の臨床検査として実施しているCMV IgG検査が陰性であった妊婦に対し、医師が文書で説明を行い、同意を得られた場合、本研究の対象者とする。研究対象者に対し、通常の妊娠中検査と同時に10ml血液を追加採取(通常診療と同時実施の研究行為)、各施設で連結可能匿名化の後、検査会社に送付し、抗体の陽転化の有無を検査する(研究行為)(今後検査業者と委託契約を結び依頼予定)。妊娠中CMV IgGの陽転例は結果を採血施設に通知するとともに、血清は、日南病院・福島医科大学・神戸大学産婦人科・共同研究企業に送付し、Avidity検査(研究行為)を行う。これにより参加希望する各メーカーの検査法・検査キットの検定比較・統計解析を行い、Avidity検査(研究行為)の標準化を行うとともに、臨床的有用性等の評価を行う。また、IgG抗体陽転妊婦の出生児の尿を採取し尿中のCMV核酸検査及びウイルス分離を感染研で実施、CMV先天感染の確定診断を行う(研究行為)。結果は医療機関に返却する。妊婦の血清は、日南病院・福島医科大学・神戸大学産婦人科では研究終了まで保存するが、共同研究企業では検査終了後破棄する。出生児の尿は感染研で研究終了まで保存する。

トキソプラズマのAvidity検査開発

* 前向き研究

妊娠中の臨床検査として実施されているトキソプラズマIgM検査(通常診療)が陽性で初感染が確認され場合、妊婦に医師から文書で説明の上で同意を得て研究対象者とす

る。連結可能匿名化し、妊娠中に必要とされる臨床血液検査の際に血液10mlを追加採取し（妊娠期間中7回程度、通常診療と同時実施の研究行為）、血清を日南病院・福島医科大学・東京大学女性外科、共同研究企業に送付しAvidity検査（研究行為）を行う。参加希望する各メーカーの検査法・検査キットの検定比較・統計解析を行い、また、東大・神戸大学を中心に臨床データとの対応からAvidity検査結果について臨床的有用性等の評価を行う。分娩時に羊水を採取し（研究行為）感染研、東京大学女性外科、日南病院、共同研究企業に送付しトキソプラズマ核酸検査を行うとともに、児の血清学的検査（トキソプラズマIgM, IgG）を1歳に実施し、先天感染を確定診断する。血清は日南病院・福島医科大学・東京大学外科で、羊水は感染研、東京大学女性外科、日南病院で研究終了まで保存するが、共同研究企業では検査終了後破棄する。

感染児レジストリ・治療薬開発・コホート調査

* 前向き研究

感染児レジストリ：CMVとトキソプラズマの先天性感染と診断あるいは可能性が非常に高い児について国内の患者についてのレジストリシステムを作成し、母子感染の実態を把握するとともに、フォローアップを行い実態の調査を行う。本研究班の中で先天感染として診断された児についても同意を得られた児についてはレジストリに登録し、成長発達、合併症などについてフォローし（通常診療と同時実施の研究行為）、先天感染の病状を明らかにする。レジストリでは保護者の同意の下で医師より説明される。記載の性別、生年月日、医療機関名・診療科、担当医、出生時状況（週数、体重、身

長、頭囲、仮死の有無、その他の特記事項）、フォローアップ（年月日、年齢、医療機関、診療科、担当医、既往症、聴覚異常、眼底異常、身体所見、発達全般、運動発達、言語発達、頭部画像所見）の情報を登録する（通常診療と同時実施の研究行為）の情報を登録する。なお、レジストリの詳細は決定次第、追加申請する。

C. 研究結果

当院、宮崎大学医学部産婦人科での平成25年度の成果は以下の通りである。今年度は研究初年度として研究体制の構築を中心に行い当院での倫理委員会で承認され採血業務が開始した。

1. 後方視的検討（当院ではCMVのみ対象）倫理委員会で承認を得て、愛泉会病院の保存検体使用可能となり愛泉会病院の峰松先生が担当、研究に必要な症例について患者の同意の後測定する予定である。

2. 前方視的検討

当院においてH25年11月12日倫理委員会で承認（承認番号 2013-100）を得た。H25年12月25日の病院運営審議会で、患者負担（CMV-IgG, IgM）に関する料金設定を承認。検体の保存場所の確保、冷凍・冷蔵保存場所の確保、検体搬送体制を確認、確立した。H26年2月から当院外来の妊婦を対象に当研究について説明を開始し同意の得られた妊婦を対象に採血、研究対象者のH26年3月20日現在、妊娠初期検査を行った12名の妊婦のうちトキソプラズマ抗体（IgG, IgM）でIgM陽性の妊婦は0名である。一方、サイトメガロウイルス抗体でIgG陰性の妊婦が2名認め研究への同意があり今後妊娠期間中に採血を行う。

D. 考察

現在、トキソプラズマおよびサイトメガロウイルスに関する検体を収集している段階である。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤事業）
分担研究報告書

母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究

研究分担者 増崎英明 長崎大学産婦人科 教授

研究要旨

サイトメガロウイルスとトキソプラズマの母子感染の現状について調査を行い、包括的な医療体制の構築医療技術の開発を行う。

A . 研究目的

サイトメガロウイルスとトキソプラズマの母子感染についての包括的な医療体制の構築、医療技術の開発を行うことである。

B . 研究方法

妊婦のサイトメガロウイルス感染および新生児の先天性 CMV 感染疑い症例の診断の確立するために、妊娠 12 週頃と妊娠 36 週頃の妊婦健診採血の際に CMV IgG を測定し、CMV IgG 陰性例が陽転化した例の Avidity を測定する。IgG 陽転例から出生した児は長崎大学小児科へ紹介し、検査とフォローアップ、レジストリへの登録が行われる。

トキソプラズマの Avidity 検査開発を行うために、妊娠 12 週頃の妊婦健診採血の際にトキソプラズマ IgM を測定し、IgM 陽性例から出生した児は長崎大学小児科へ紹介し、検査とフォローアップ、レジストリへの登録が行われる。

上記を行い、それらは総括され、包括的な医療体制の構築を行い、診断と治療にむけた医療技術の開発が行われる。

倫理的配慮に関して、妊婦に対して医師より文書にて説明を行い、同意書を得る。研究に参加しないことで診療上、不利益になることはないことを説明する。なお、本研

究は長崎大学病院倫理委員会で承認が得られた（承認番号 13102881）。

C . 研究結果

現在、長崎県におけるスクリーニング方法とその運用について策定を進めている。母子感染の可能性についてのカウンセリングは、長崎大学病院小児科と連携した体制を整備している。

トキソプラズマ感染症におけるアセチルスピラマイシン等の薬物治療には、長崎大熱帯医学研究所感染症内科と連携して処方するシステムを構築している。母子感染症が疑われる児について、長崎県内NICUの受け入れ体制を整備している。

D . 考察

本感染症の妊婦抗体スクリーニングシステムには、検査体制に加えて、カウンセリング体制、感染症治療システムおよび児の受け入れ体制の整備が重要であった。

E . 結論

サイトメガロウイルス・トキソプラズマ感染症について、長崎県における妊婦の抗体スクリーニングシステムを構築した。

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A, Miura S, Yamasaki K, Yoshiura K, Masuzaki H. Initial viral load in cases of single human papillomavirus 16 or 52 persistent infection is associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix. J Med Virol. 2013;85:2093-2100.
2. Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H.: Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer. J Hum Genet. 2013;58(5):250-3.
3. H Moriuchi, H Masuzaki, H Doi and S Katamine: Mother-to-child Transmission of Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1. The Pediatric Infectious Disease Journal Vol.32, Number2, Feb p175-177, 2013.
4. 増崎英明：厚生労働科学研究費 25年間継続した妊婦のHTLV-1抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発. 平成24年度厚生労働科学研究費 HTLV-1関連疾患研究領域研究班合同発表会 p5, 2月16日 2013
5. 増崎英明：母子保健のバージョンアップ「HTLV-1母子感染対策事業における保健師の役割-長崎県における取り組みを中心に」. 保健師ジャーナル 69(10):795-800,2013
6. 増崎英明：HTLV-1母子感染. 別冊 日本

臨床 新領域別症候群シリーズ No.25

感染症症候群(第2版) p708-711 2013

7. 三浦清徳、築山尚史、増崎英明：性感染症と母子感染 -最近の診断と管理-」II. 母子感染 4(11)HTLV-1,臨床婦人科産科 2013;67 巻1号:152-162.
8. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明:長崎県において26年間継続した妊婦のHTLV-1スクリーニング検査から得られた母子感染防止効果の検証とスクリーニングシステムの開発. 九州連合産科婦人科学会誌, 2013;64巻:66-69
9. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明:長崎県におけるHTLV-1母子感染防止の取り組み. 日本産婦人科・新生児血液学会雑誌 22:45-54,2013

2. 学会発表

1. Kiyonori Miura, Shuhei Abe, Akira Kinoshita, Hiroyuki Mishima, Shoko Miura Koh -ichiro Yoshiura, and Hideaki Masuzaki: Copy number variation of the antimicrobial-gene, *defensin beta 4*, is associated with susceptibility to cervical cancer. Proceeding of The 63th Annual meeting of American Society of Human Genetics. p247, 2013.
2. Naoki Fuchi, Kiyonori Miura, Takashi Tsukiyama, Daisuke Sasaki, Naoko Inokuchi, Katsunori Yanagihara, Shimeru Kamihira, Hiroyuki Moriuchi, Koichiro Yoshiura, Hideaki Masuzaki: Proviral loads of human T-cell leukemia virus type 1 in the peripheral blood samples from carrier pregnant women. Proceeding of The 63th Annual meeting of American Society of

- Human Genetics. p229, 2013.
3. Kazuaki Ohashi, Kiyonori Miura, Shuhei Abe, Akira Kinoshita, Shoko Miura, Daisuke Hamaguchi, Koh-ichiro Yoshiura and Hideaki Masuzaki: Initial viral load in cases of single human papillomavirus 16 or 52 persistent infection is associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix. Proceeding of The 63th Annual meeting of American Society of Human Genetics. p252, 2013.
 4. 三浦清徳、築山尚史、森内浩幸、増崎英明：長崎県における出生年代別にみた妊婦 HTLV-1 キャリアの比較検討．第 49 回日本周産期新生児医学会
 5. 三浦清徳、築山尚史、猪口直子、佐々木大介、上平 憲、柳原克紀、森内浩幸、吉浦孝一郎、増崎英明：HTLV-1 キャリア妊婦から出生した児における臍帯血中の HTLV-1 抗体価およびプロウイルス量に関する検討
第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム
 6. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：HTLV-1 キャリア妊婦から出生した児における臍帯血中の HTLV-1 抗体価およびプロウイルス量に関する検討．第 36 回母体胎児医学会
 7. 築山尚史、三浦清徳、佐々木大介、猪口直子、土井裕子、長谷川寛雄、柳原克紀、上平憲、森内浩幸、吉浦孝一郎、増崎英明：妊婦 HTLV-1 スクリーニングシステムにおけるリアルタイム PCR 検査の有用性に関する検討．第 65 回日本産婦人科学会学術講演会
 8. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：妊婦 HTLV-1 スクリーニングシステムにおけるリアルタイム PCR 検査の有用性に関する検討．第 70 回九州連合産科婦人科学会
 9. 築山尚史、三浦清徳、森内浩幸、増崎英明：HTLV-1 キャリアの妊婦における倫理的問題点とその対応．第 49 回日本周産期新生児医学会
 10. 淵直樹、築山尚史、吉田敦、三浦清徳、増崎英明：妊娠と分娩後における HTLV-1 プロウイルス量の推移に関する検討．第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム
3. 研究報告
1. 増崎英明、吉浦孝一郎、三浦清徳、三浦生子 他：25 年間継続した妊婦の HTLV-1 抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発（H23-新興一般-026）平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）総括・分担研究報告書 P1-120, 2013

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

静岡県西部地区における過去15年間におけるサイトメガロウイルス抗体保有率の推移

研究分担者 金山尚裕 浜松医科大学産婦人科 教授

研究協力者 山下美和 浜松医療センター産婦人科 科長

研究要旨

わが国では妊婦 CMV 抗体保有率の低下が報告されており、先天性 CMV 感染症の増加が懸念されている。われわれは静岡県西部地区の産婦人科医会の協力を得て妊婦 CMV 抗体保有率の調査を 1996 年より開始した（1 - 2）。1996 年 6 月より 2011 年 12 月までに検査を受けた妊婦 20,508 人の CMV 抗体保有率について報告する。

研究方法：妊娠初期（20 週頃）までに同意を得られた妊婦に対して CMV IgG 抗体を EIA 法で検査した。1998 年 3 月まではベーリング社製、以降はデンカ生研製のキットを用いた。

研究結果：札幌医科大学の鎌田らの報告によると 1986 年にはわが国の CMV 抗体保有率は 98% と報告されていた。しかし今回の結果では 1996 年から 1999 年までは 77.4%、2000 年から 2002 年までは 72.8%、2003 年から 2005 年までは 69.6%、2006 年から 2008 年は 70.7%、2009 年から 2011 年までは 66.7% であり、妊婦 CMV 抗体保有率は明らかに低下していた（図 1）。

上記 20,508 人中 IgG 抗体陰性で妊娠後期に再検したのは 1443 人であった（注：妊娠初期 IgG 抗体陰性例は約 6200 例あるが、妊娠後期に採血できたのは 1443 例）。そのうち妊娠中に IgG が陽転化した人は 28 人いた。28 人のうち新生

児尿の CMVPCR が検査できたのは 23 例で PCR 陽性者は 5 人であった。

まとめると妊婦 CMV 抗体保有率は年とともに低下していることが多数例の検討から明らかになった。妊娠中に CMV に初感染した妊婦は妊娠初期に CMV IgG 抗体陰性妊婦のうち 1.9% (28 人) であった。そのうち 23 例に新生児尿の PCR が行われ、0.3% (5 例) に感染が認められた。

考察：近年 CMV の抗体保有率が低下していることが静岡県西部地区で明らかになった。3 割以上の妊婦が妊娠中に初感染する可能性があることが示された。妊娠初期に CMV 抗体がない妊婦のうち妊娠中に CMV 感染したと思われる女性は約 2% であった。胎児感染が起こったと考えられる症例は 0.3% であったので、妊婦が初感染した場合その約 3 分の 1 に胎児感染が成立することが推測される。胎児感染を診断するのに IgG avidity 検査は有用であることが示されており、IgG 陽転化例には

avidity 検査を静岡県西部地域のサイトメガロウイルス対策事業に組み入れていく予定である。

杉村 基, 金山 尚裕, 峰松 俊夫,
楠元 和美, 金子 政時, 池ノ上 克
日本周産期・新生児医学会雑誌 42
巻 785-788, 2006

参考文献

- 1) サイトメガロウイルス(CMV)と周産期
先天性サイトメガロウイルス感染症と
IgG Avidity 山下 美和, 前田 真,

- 2) サイトメガロウイルス 山下 美和,
金山 尚裕 産科と婦人科 71 巻 Suppl.
77-81, 2004.

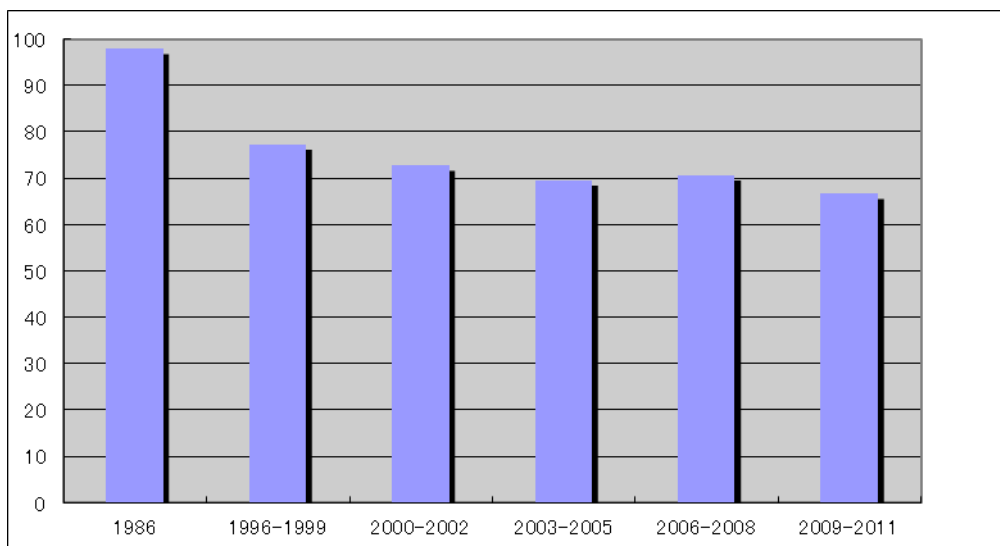


図 1 : 妊婦抗体保有率の推移 (1986 年は札幌医大鎌田らの参考値)

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代成育基盤研究事業）

分担研究報告書

サイトメガロウイルス、トキソプラズマの母子感染スクリーニングのための Avidity 検査導入を
目指した周産期施設における検査体制の確立とデータ保存 に関する研究

研究分担者 川名 敬 東京大学医学部附属病院・女性診療科 准教授

研究要旨

妊婦健診におけるサイトメガロウイルス(CMV)およびトキソプラズマ(TOX)の母児感染スクリーニング検査の導入と、そのために必要なデータ保存体制の確立を目的として分担研究を開始した。すでに体外診断の承認を受けている血清 IgG、IgM 測定キットによる母体血清中の値をもとにこれまで約 300 例に対してスクリーニングを行った。CMV について妊娠女性の IgG 陽性率は 76%であった。血清 IgM の陽性者が 5%存在したが Avidity 検査による感染時期の推定では妊娠中の感染は全例で否定的であった。そのため、臨床的対応が必要となる真の妊娠中の感染者の検出は従来の IgM を基準にする方法では困難であることが明らかとなった。TOX については IgM 陽性者は 0.3%で感染疑い例が少なく、症例を蓄積した上でのスクリーニング法の有効性の評価が必要である。

A.研究目的

サイトメガロウイルス（CMV）、トキソプラズマ（TOX）による胎内感染は胎児、出生児に重篤な全身的な臓器障害を起こす周産期医療において克服すべき重要な母子感染症である。CMV に関する新生児スクリーニング検査では約 300 人に 1 人という高い確率で先天感染が生じていることが明らかとなった。また、近年の母体の CMV 抗体保有率の低下が指摘されており、今後妊娠中の母体感染の危険性が上昇する可能性が指摘されている。TOX に関しては CMV よりも胎内感染の発生率は低いと考えられているが我が国における大規模な調査はなくその実態は不明である。

従来、妊娠中の感染の診断において CMV、TOX に対する血清学的 IgG、IgM 検査が行われてきたが、persistent IgM、偽陽性など臨

床診断の上での問題がある。一方で Avidity の測定は感染時期の推定の評価に有効性が高いことが報告されており日常臨床への導入が強く望まれているが、現在のところ未承認である。また、我が国の妊婦健診体制に CMV、TOX のスクリーニング検査を導入する場合の方法、検査時期についての根拠となるデータが乏しい。さらに先天性感染児に対する治療体制は確立されていない。

本研究ではこうした問題を解決すべく開始された“母児感染の実態把握および検査・治療に関する研究”の下で、妊婦健診におけるスクリーニング検査の導入、そのために必要なデータ保存体制の確立を目的として分担研究を行った。

B.研究方法

施設研究倫理委員会の承認の下で以下の研究を行った。東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科の妊婦健診外来に受診する妊婦を対象に CMV、TOX のスクリーニング検査を 2014 年 10 月より開始した。スクリーニングの方法としては妊娠 12 週前後の採血により血清中の IgG、IgM の測定を全例に施行した。測定法は検査会社 SRL に依頼した上で検査キットは CMV はデンカ生研株式会社のウイルス抗体 E I A「生研」サイトメガロ IgM、IgG を使用し、TOX はパイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社のプラテリアトキソ IgG、IgM を使用して行われた。CMV、TOX のそれぞれの結果で IgG 陰性 IgM 陰性を未感染群、IgG 陽性 IgM 陰性を既往感染群、その他の IgM 陽性例を感染疑い群として以下の対応を行った。また、母児感染研究の対象症例として血清保存、Avidity 測定などの追加的検査を行う妊婦に対しては書面による研究の同意説明を行った。

CMV 初期スクリーニングの結果への対応

A 未感染群：

その後の妊娠中に感染が疑われた場合に感染時期を推定を目的とした Avidity 検査のため妊娠中期(20 週前後)、中後期(28 週前後)、後期(35 週前後)の時期に 10ml の採血を行い血清を保存した。後期の採血に際しては CMV の IgG、IgM の測定を再度行い IgG の陽性化した症例を妊娠期間中の母体感染と判断した。感染の可能性が高い妊婦については妊娠中の胎児超音波検査による精査を行い、出生後の児に対して東京大学医学部附属病院小児科にて先天性感染の評価、治療の必要性について診療を行う予定とした。

また、妊娠中の感染予防についての情報提供のためのパンフレットを配布した。

B 既往感染群：

妊婦に妊娠中の感染のリスクは極めて低いことを説明した。希望者には情報提供のパンフレットを配布した。

C 感染疑い群：

初回の IgG、IgM 採血後 2 週間以上経った時点で再度 CMV IgG、IgM の検査を提出して抗体価の変化を確認した。また、その際に同時に母体血清を愛染会日南病院 疾病制御研究所に送付し Avidity 測定を行った。抗体価の変化、Avidity の結果より感染の有無、感染時期に関する評価を行った。

TOX 初期スクリーニングの結果への対応

A 未感染群：

妊娠中の感染予防についての情報提供のためのパンフレットを配布した。

B 既往感染群：

妊婦に妊娠中の感染のリスクは極めて低いことを説明した。希望者には情報提供のパンフレットを配布した。

C 感染疑い群：

初回の IgG、IgM 採血後 2 週間以上経った時点で再度 CMV IgG、IgM の検査を提出して抗体価の変化を確認した。また、その際に同時に母体血清を福島県立医科大学生微生物学教室に送付して Avidity 測定を行った。抗体価の変化、Avidity の結果より感染の有無、感染時期に関する評価を行った。感染の可能性が高いと判断した妊婦に対しては、胎児超音波による精査を行い、また薬物療法による胎内治療の選択肢を提示した。

C. 研究結果

2013年10月より2014年2月末までの時点で、約300例の妊婦にスクリーニングとしてCMV、TOXのIgG、IgMの血清学的検査を施行した。

CMVについて

2月末までの段階で、IgG陰性者71名(23.7%)、IgM陽性者15名(5%)であり、未感染群約24%、既往感染群約71%、感染疑い群5%となった。IgM陽性の感染疑い例についてはAvidityを測定して全例が40%以上の値であり、またそれらのAvidityが高い症例群では初回の検査から2週以降に再度抗体価を検査した値について初回の検査値との変化はIgG、IgM値のいずれも2倍以内であった。本研究を開始後に初回のCMVスクリーニングを施行した妊婦の大部分が妊娠継続中であり、後期採血でIgG抗体が陽転化した症例は現在のところ認めていない。

TOXについて

2月末までの段階で、感染疑い群であるIgM陽性者は1名(0.3%)確認された。その妊婦の血清のAvidity測定依頼を行い結果は未着である。

D. 考察

CMV、TOXのIgG、IgM抗体測定によるスクリーニングを妊婦健診に導入して現在まで妊婦への検査内容や結果の説明に関して診療上大きな混乱を生じることなく実施できている。パンフレットを作成してそれに基づく説明を行っていることが妊婦への理解を促進していると考えられる。

妊娠女性のCMV IgG抗体保有率は東京大学医学部附属病院において約76%であり先行研究で指摘されている近年の抗体保有率低下を裏付ける結果となった。CMVのIgM抗体検査では陽性が5%÷15例に確認されたが、それらの症例のAvidity検査の結果では胎児への影響が懸念される妊娠中の感染と推定された症例は現在のところ認めていない。このことから血清中IgM値による感染例の検出は偽陽性が多くなると考えられる。このことはCMVスクリーニングについては血清IgG、IgMによる方法には問題があり、Avidity検査など新たな検査法の導入の必要性が高いと考えられる。現時点では初期にスクリーニングを行った妊婦の多くが分娩に至っておらず、妊娠中のIgG陽転化する症例の頻度やそうした症例についてAvidity測定の有効性については研究の継続が必要である。

TOXについては、これまでのところ感染が疑われるIgM陽性例は1例(0.3%)であり、研究を継続して症例を蓄積した上で評価が必要である。

E. 結論

妊娠女性に対するCMV、TOXのスクリーニングを開始した。CMV抗体保有率は76%であった。血清CMV IgM測定のみでは臨床的対応が必要となる真の妊娠中の感染者の検出は困難であることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taguchi A, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, Nagasaka K, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Koga K, Wada-Hiraike O, Oda K, Kang JX, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T, Matrix metalloproteinase

- (MMP)-9 in the cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acid in vitro and in vivo, *PLOS One*, in-press, 2014
- 2) Taguchi A, Wada-Hiraike O, Kawana K, Koga K, Yamashita A, Shirane A, Urata Y, Kozuma S, Osuga Y, Fujii T, Activation of SIRT1 by resveratrol suppresses inflammatory responses in endometriosis, *J Obstet and Gynecol Res*, E-pub, 2013
 - 3) Yamashita A, Kawana K, Tomio K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Masuda K, Furuya H, Nagamatsu T, Nagasaka K, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yamashita T, Taketani Y, Kang JX, Kozuma S, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T, Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth, *Sci Rep*, E-pub, 2013
 - 4) Tomio K, Kawana K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Yamashita A, Kojima S, Mori M, Nagamatsu T, Oda K, Osuga Y, Taketani Y, Kang JX, Arai H, Arita M, Kozuma S, Fujii T, Peritoneal endometriosis is suppressed by endogenous and exogenous omega-3 polyunsaturated fatty acids, *PLOS One*, 10;8(9):e73085, 2013
 - 5) Ichinose M, Fujimoto A, Osuga Y, Minaguchi T, Kawana K, Yano T, Kozuma S, The Influence of Infertility Treatment on the Prognosis of Endometrial Cancer and Atypical Complex Endometrial Hyperplasia, *Int J Gynecol Cancer*, 23: 288-293, 2013
 - 6) Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Nagamatsu T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S, The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN, *Am J Reprod Immunol*, 69: 134-141, 2013
 - 7) Sayama S, Nagamatsu T, Schust DJ, Itaoka N, Ichikawa M, Kawana K, Yamashita T, Kozuma S, Fujii T. Human decidual macrophages suppress IFN- γ production by T cells through costimulatory B7-H1:PD-1 signaling in early pregnancy. *J Reprod Immunol*, 100: 109-117, 2013
- 2 . 学会発表
- 1) Kawana K, Immunotherapy for cervical neoplasia through HPV E7-specific mucosal immunity, The 51th Annual meeting of Japanese Society of Clinical Oncology (JSCO2013), Kyoto, 2013. 10. 25
 - 2) Kawana K, A novel approach: Immunotherapy for cervical intraepithelial neoplastic (CIN) lesions through HPV E7-specific mucosal immunity, The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2013.9.11
 - 3) 川名 敬, HPV 感染症を見直すー基礎から臨床までー、日本性感染症学会教育講演、11月、岐阜
 - 4) 井上知子、川名 敬、田口歩、大須賀穰、藤井知行、CIN治療を目的としたE7発現型乳酸菌HPV経口ワクチンによるE7特異的粘膜免疫誘導能は合成セラミド α -GalCerと漢方薬併用経口投与により増強する。日本産科婦人科学会第65回学術講演会 2013年5月
- H . 知的財産権の出願・登録状況
特になし

CMV 核酸検査法の開発

研究分担者 井上 直樹 岐阜薬科大学生命薬学大講座感染制御学研究室・教授

研究要旨 確定診断のための CMV 核酸検査を体外診断用医薬品化するために、共同研究企業と手順等を決定し、現在性能評価試験が順調に進行している。また、CMV スクリーニング検査法の開発についても、尿を採取するための濾紙の再選定を行い、価格・安全性・簡便を改善しコマーシャル化に一步近づいた。発症リスクとして同定した NK 受容体の遺伝子多型について、その分子機序の解析を行ったが、MICA の結合や Akt のリン酸化などシグナル伝達系の上流には大きな差は見られなかった。

研究目的

先天性 CMV による障害は早期診断できれば言語・認識能力形成等の早期介入により一定の機能的回復を図ることができる。また、抗ウイルス薬による予後の改善が欧米から報告されている。しかし、聴覚障害に限ってみても、現行の新生児聴覚検査では先天性 CMV 感染に伴う難聴の半数以上が検出できない。従って、出生時に先天性 CMV 感染児をスクリーニングし、確定診断を行うことにより、抗ウイルス薬による早期治療やフォローアップによる難聴や精神発達遅滞などの後遺症発症時の早期介入することが現時点で最善の先天性 CMV 感染症対策と考えられる。

先天性 CMV 感染の同定には、尿に高力価の CMV が排泄されることを利用して、出生後 2-3 週以内に採取した尿中の CMV のウイルス分離が確立した方法として行われてきたが、分離までに時間と労力を要することから、近年核酸検査が用いられるようになってきた。しかしながら、先天性 CMV 感染疑い児の確定診断に用いる核酸検査法は、体外診断用医薬品とはなっていないため、検査センターなどでも実施されていない、もしくは研究検査とされているなど変則的な状況にある。さらに、全新生児を対象にした大規模な先天性 CMV スクリーニング検査が行われ難かった背景としては、核酸検査をもってしても、尿を液体として採取し、ここから DNA を精製するためには労力と費用が必要で

あることがあげられる。欧米では、乾燥血、いわゆるガスリー血濾紙、を用いたスクリーニングが試みられているが、血液中の CMV 量が極めて少ないためスクリーニングの感度が低い。我々は、簡便迅速かつ安価な先天性 CMV のスクリーニング法として、尿を吸収した濾紙片そのものを鋳型としてリアルタイム PCR を行う方法を開発し、その臨床的応用が可能であることをすでに示してきた。

本研究では以下のことを行う。1) 研究班と共同研究契約を締結した核酸検査試薬・機器メーカーとの共同研究として、新生児における先天性 CMV 感染の確定診断のための核酸検査法を確立し、体外診断用医薬品として申請が可能となるようにする。2) 我々が開発した尿濾紙を用いた先天性 CMV スクリーニング法をコマーシャル化し、全新生児を対象としてスクリーニングを可能とし、スクリーニングで CMV 感染が疑われた新生児について、上記の体外診断医薬品としての核酸検査法で確定診断が行える体制を構築できるようにする。3) これまでの厚生労働科学研究班で構築された先天性 CMV 感染児のコホートをを用いて、感染や発症のリスク因子として、自然免疫に關与する遺伝子群について、遺伝子多型との関連を検討し、相関がある場合、その分子機序を明らかにする。

B. 研究方法

1. ウイルス分離及び培養

ヒト 2 倍体細胞 HEL は、10%牛胎児血清 (FBS)添加 Dulbecco's MEM(DMEM)培地にて培養した。先天性感染の場合、1 週間以内に細胞変性効果が出てくるので、非感染細胞を適宜加えながら 2-4 回継代し、感染細胞及び培養上清をそれぞれ回収し、ストックを作成した。分離されてきたものが、CMV であることは、抗 CMV IE2 抗体(Chemicon)を用いて免疫染色により同定した。3 回盲継代し約 3-4 週の培養を行っても、細胞変性効果が見られない場合には、CMV 陰性とした。

共同研究に用いる標準品用に、AD169 株をヒト 2 倍体細胞 HEL に MOI=0.5 で感染させ、5 日後に培養上清を調製した。感染力価は、上清の希釈系列を HEL 細胞に感染し、2 日後に抗 CMV IE2 抗体を用いて免疫染色して陽性となったフォーカス数をもとに決定した。

2. 液体尿中 CMV DNA 定量

尿検体は QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) を用いて DNA 精製を行った。TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied) に CMV UL83 遺伝子を標的とした 0.2 μ M プライマーと 0.125 μ M プロブ、50ng サケ精子 DNA 加えた 25 μ l 反応液を用いて、50 $^{\circ}$ C 2 分と 95 $^{\circ}$ C 10 分の初期ステップ、95 $^{\circ}$ C 30 秒 60 $^{\circ}$ C 1 分の増幅サイクルで測定した。

3. 尿濾紙片のリアルタイム PCR

尿を含む濾紙より 3 ミリ径の濾紙片をパンチにて打ち抜く。濾紙片は、200 μ l の水洗後、もしくはそのまま、鋳型としてリアルタイム PCR 反応に供する。

Brilliant QPCR Master Mix に CMV UL83 遺伝子を標的とした 0.2 μ M プライマーと 0.125 μ M プロブ、5 μ g BSA(NEB)と 100ng サケ精子 DNA 加えた 50 μ l 反応液に、3 ミリ径の濾紙片を加え、50 $^{\circ}$ C 2 分と 95 $^{\circ}$ C 15 分の初期ステップ、95 $^{\circ}$ C 15 秒 58 $^{\circ}$ C 30 秒及び 72 $^{\circ}$ C 30 秒の増幅サイクルで、MX3000P (Stratagene)を用いて測定した。

各検査試薬・機器メーカーの検査開発に当た

っては、液体尿及び尿濾紙片について、各社の仕様条件を至適化した。

4. NKG2D の MICA 結合能の解析

遺伝子多型と先天性 CMV 感染症の出生時症候性との間に相関があった NKG2D の major 型と minor 型遺伝子を発現ベクターにクローニングした。また、NKG2D のアダプター分子 DAP10 発現プラスミドも構築した。293T 細胞にリン酸カルシウム法で NKG2D と DAP10 プラスミドを遺伝子導入後、NKG2D の細胞膜上発現を、抗 NKG2D 抗体でフローサイトメーターを用いて確認した。また、MICA の膜貫通領域を HaloTag 蛋白と置換し、MICA-HaloTag 融合蛋白を遺伝子導入した 293T 細胞の培養上清に分泌できる発現プラスミドを構築した。MICA の培養上清を、major もしくは minor 型 NKG2D と DAP10 を発現する 293T 細胞に添加し、抗 NKG2D 抗体と HaloTag 結合性蛍光リガンドを用いて、MICA と NKG2D の結合をフローサイトメーターで検討した。

5. Akt リン酸化による NKG2D 活性化の検出

DAP10 と NKG2D を 293T 細胞に transfection し、MICA も別の 293T 細胞に transfection した。その後 DAP10・NKG2D 発現細胞に MICA 発現細胞を co-culture した後、抗 Akt 抗体で免疫沈降し、pan-Akt と phospho-Akt の 2 種類の抗体でウエスタンブロッティングを行い、リン酸化された Akt の割合を求めた。

(倫理面の配慮)

本研究は、研究班に参加する各研究者の関連機関、前任地である国立感染症研究所及び岐阜薬科大学(全関連機関での承認と同意書の提出を前提とした条件付承認)の倫理委員会の承認を受けて行われた。

C. 研究結果

1. 先天性 CMV 感染確定診断を目的とした核酸検査法の体外診断用医薬品化のための研究

CMV 核酸検査共同研究企業3社と薬事担当者も交え、数回の会議を行い、必要な検体や試験についての手順を決定した。その決定に基づき作業を進めている。1月9日現在の進捗は以下の通り。

1) 国際共同研究により策定された WHO 標準品 (Merlin 株) を入手し、国内検査センターなどで一般的に使用されている AD169 株を大量に培養後、培養上清を多数のバイアルに分注し、WHO 標準品を用いて値付けをした。この研究班用の標準品を共同研究メーカー等にも配布し、各社の核酸検査法により予想通りの数値となるかなどの評価を進め、体外診断用医薬品としての性能試験を実施するための準備を行った。3社中1社が、研究班発足後の遅れた参加であったため、完了していないが、残り2社分については、作業をほぼ完了させた。

2) 研究班研究分担者より送付された新生児尿検体 17 人分について、核酸検査及びウイルス分離を実施し、すべての検体の CMV 陰性を確認した。核酸精製過程を必要としない2社の検査法で上記尿検体が核酸増幅反応を阻害するかを検討したところ、17 検体中 1 検体で強く阻害、1 検体で弱く阻害した。尿量を減らせば問題がないことが判明したため実用的には問題がないと判断した。

3) 上記の新生児尿をプールした陰性標品、ウイルス標準品をスパイクした陽性標品を調製し、配布準備を完了した。1月13日に進捗確認会議を共同研究企業と行い、手順書を確認するのを受けて、申請用性能試験(主に感度評価)を早々に実施する予定である。

4) 1-4 歳程度の 50-100 人の健常児について、CMV 血清学検査を実施するとともに、尿を採取し核酸検査法の性能評価(主に特異性)を行う予定である。標準検査は、これまでの in-house 検査法による CMV 定量法を用いて行う。現在までに 10 人分の尿しか採取できていないため、当初の旭川医大

のみであった採取施設を、急遽増やすために倫理委員会承認などの手続きを進め、早急に問題を解決できるように小児科施設が努力している。今後の予定としては、20 検体程度が集まり次第、新生児尿と健常児で検査結果に差がないことを確認すること、必要検体がそろった時点で、検体の配布と測定を一斉に実施することの手順が決まっている。

5) 性能試験が完了した時点で、保存尿検体を用いて臨床有用性の証明試験を行う。

2. CMV スクリーニング検査法の開発

我々が開発した CMV スクリーニング法を用いた新生児の検査は 2 万 5 千人以上で実施され、臨床的に有用であることが既に示されている。しかし、コマーシャル化の限界として 特殊濾紙の単価が高い、稀に濾紙によるかぶれがある、反応前に濾紙を水洗するステップがあるため小型卓上遠心機が必要となる、などが明らかになっている。そこで、開発の原点である濾紙選定の再検討を行った。かぶれの原因となっていたと思われる界面活性剤等の塗布がない計 20 種類の濾紙を大手濾紙メーカー2社から入手し、水洗浄がなくても尿濾紙片中の CMV 検出の感度が低下しないものを 2 種類同定した。先天性感染児 1 名で採尿テストを行い、かぶれや感度においては問題がないことを確認した。その過程で、濾紙に着色した方が、採尿が行われたことを確認しやすいという現場の要請があった。このため、濾紙メーカーに食品添加物として登録された着色料を用いた見本濾紙の作製を依頼し、上記 2 種類の濾紙について、それぞれ 3 色にした見本を得た。検討の結果、青色及び黄色の着色が核酸検査の検出系を阻害しないことが明らかとなった。

今後、新生児で尿採取して問題がないかを検討する予定である。

3. 先天性 CMV 感染症の感染・発症リスク解析

これまでの研究で、出生時症候性と NKG2D 多型に有意な相関を認めた。NKG2D は、CMV 感染によるシグナル制御に関連していることが知られていることから、多型が感染に伴うシグナル制御に与える影響を検討した。

まず、major 型及び minor 型の NKG2D が、リガンドである MICA との結合において差があるか検討したが、両者に差は見られなかった。

次に、NKG2D のシグナル伝達に差がないかを検討するため、シグナル伝達系の中に位置する Akt のリン酸化の多型による影響を検討したが、リン酸化に若干差が認められたという程度であった。条件をさらに検討して、有意な差であるかどうかを明らかにする予定でいる。また、Akt より下流への影響も考え、現在、核内での遺伝子発現を検討中である。

D. 考察

1. 体外診断用医薬品化のための研究は順調に推移しているが、CMV 感染児の検体として必要な症例数など、PMDA との事前協議を進める方が良いと思われる。

2. 新生児 CMV スクリーニングを最終的にコマース化できる目処はつきつつあるが、どのような形で小規模なパイロット調査を実施するかを検討することが望ましいと思われる。

E. 結論

- 1) 確定診断のための CMV 核酸検査については、共同研究企業と手順を決定し、性能評価試験が順調に進行している。
- 2) CMV スクリーニング検査法の開発については、尿を採取するための濾紙の再選定により、コマース化できる目処がつきつつある。
- 3) 発症リスクとしての NK 受容体の遺伝子多型の分子機序には、MICA の結合や Akt のリン酸化より上流のシグナルには大きな差は見られ

なかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Pereira L, Petitt M, Fong A, Tsuge M, Tabata T, Fang-Hoover J, Maidji E, Zydek M, Zhou Y, Inoue N, Logahvi S, Pepkowitz S, Ogunyemi D. Idiopathic intrauterine growth restriction caused by cytomegalovirus infection and associated placental pathology. *J Infect Dis In Press*

Taniguchi R, Koyano S, Suzutani T, Goishi K, Ito Y, Morioka I, Oka A, Nakamura H, Yamada H, Igarashi T, Inoue N. Polymorphisms in Toll-like receptor 2 are associated with congenital cytomegalovirus infection. *Int J Infect Dis* 17(12): e1092-7, 2013

Matsuo K, Morioka I, Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, Inoue N, Sugimura K, Yamada H, Iijima K. Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Brain & Dev* 36(1):10-5, 2014

Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers. *J Clin Virol* 58: 474-478, 2013.

Koyano S, Inoue N, Nagamori T, Moriuchi H, Azuma H. Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding. *Arch Dis Child Fetal* 98: F182, 2013.

2. 学会発表

井上直樹 基礎研究者からみた先天性 CMV 感染対策: 検査法とワクチン開発の現状と方向性 シンポジウム「母子感染」第 45 回日本小児感染症学会学術集会 札幌 2013.11

谷口留美、古谷野伸、錫谷達夫、五石圭司、伊藤裕司、森岡一朗、中村浩幸、山田秀人、岡明、井上直樹 NK 細胞の標的細胞認識に関わる遺伝子多型と先天性 CMV 感染症

の相関 第45回日本小児感染症学会学術
集会 札幌 2013.11

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

その他: なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Pereira L, Petitt M, Fong A, Tsuge M, Tabata T, Fang-Hoover J, Maidji E, Zydek M, Zhou Y, <u>Inoue N</u> , Logahvi S, Pepkowitz S, Ogunyemi D.	Intrauterine growth restriction caused by underlying congenital cytomegalovirus infection.	J Infect Dis			印刷中
Matsuo K, Morioka I, Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, <u>Inoue N</u> , Sugimura K, Yamada H, Iijima K.	Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection.	Brain & Dev	36	10-15	2014
Koyano S, <u>Inoue N</u> , Nagamori T, Moriuchi H, Azuma H.	Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding.	Arch Dis Child Fetal	98	F182	2013
Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, <u>Inoue N</u> , Fujiwara S.	Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress.	Herpesviridae	4	2	2013
Taniguchi R, Koyano S, Suzutani T, Goishi K, Ito Y, Morioka I, Oka A, Nakamura H, Yamada H, Igarashi T, <u>Inoue N</u> .	Polymorphisms in Toll-like receptor 2 are associated with congenital cytomegalovirus infection.	Int J Infect Dis	17	e1092-7	2013

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究

サイトメガロウイルス血清型・DNA 型判別法を用いた先天感染例の評価

研究分担者 錫谷 達夫 福島県立医科大学微生物学講座 教授
協力研究者 生田 和史 福島県立医科大学微生物学講座 助教

[研究要旨]

先天性サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus; CMV) 感染は出産 300 例中 1 例に認められ、既知の胎内感染で最も頻度が高い。出生時に顕性感染である 1 割には小頭症などの重篤な異常が起こっている。感染児の 9 割は出生時に無症候性であり感染を認知することはないが、そのうち 5-15% では成長に伴って難聴、精神発達遅延などの症状が出現している。

妊婦において CMV 初感染が起こった場合、その 4 割で胎児に感染が認められる。先天感染は CMV 重感染によっても引き起こされることが知られているが、どの位が重感染によるものであるのかも明らかにされていない。我々は ELISA 法を用いた CMV 血清型別判定法、リアルタイム PCR 法を用いた感染児尿中 CMV 型判定法を確立し、先天性 CMV 感染が妊娠中の CMV 初感染によるのか、異型 CMV の重感染によるのか、判別を行った。先天性 CMV 感染児とその母親 18 例の CMV 感染パターン解析を行ったところ、異型 CMV の重感染によると考えられる 2 例を見出した。我々の方法で判別できる CMV の型分けの精度では初感染または再活性化が 89%、重感染が 11%であった。

A . 研究目的

CMV はヘルペスウイルスの一種であり、健常成人の約 70% に感染しているごくありふれたウイルスである。成人では多くが不顕性感染である。妊婦の初感染は 40% の胎児に感染を引き起こすが、先天性 CMV 感染の多くは出生時に無症候性であり、何らの障害もなく発育する。しかし 5-15% では成長に従って精神発達遅延、視力障害、難聴、てんかん、けいれんなどを生じる。無症候性感染の場合は児の感染に気付くことはない。乾燥臍帯中の

CMV DNA を検出することにより、先天性 CMV 感染の後方視的な疫学調査を行った結果、日本人における聴覚障害の約 15% は先天性 CMV 感染が原因であることが明らかとなった。また先天性 CMV 感染のおよそ 10% は出生時点で既に顕性感染であり、小頭症や水頭症、脈絡網膜炎、聴覚障害、精神発達遅延、紫斑、血小板減少、肝脾腫、肝炎などが認められ、出生後早期に死亡する重篤な例もある。

先天性 CMV 感染は妊娠中の初感染のみならず、異なる型の CMV 株に重感染する

ことでも発生する。しかし症候性感染となる確率や重症度との関係は不明である。本研究では、先天性 CMV 感染児とその母親の CMV 感染パターンと感染児の臨床経過を解析することを目的に、母児の抗 CMV 型別抗体の測定ならびに感染児尿中の CMV 型判定を行った。

B . 研究方法

1 . 先天性 CMV 感染児の特定

本学附属病院産婦人科ならびに関連病院で出生した新生児の尿は、リアルタイム PCR 法を用いた CMV スクリーニング検査に供され、先天性 CMV 感染児を診断した(国立感染症研究所ウイルス一部において実施、厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)「全新生児を対象とした先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染スクリーニング体制の構築に向けたパイロット調査と感染児臨床像の解析エビデンスに基づく治療指針の基盤策定」に関する研究)。血液は Lympholyte H (Cedarlane Laboratories) を用いた密度勾配遠心法により血漿とリンパ球に分離し、-80 に保存した。先天性 CMV 感染児の血液と尿ならびに母親の血液はインフォームドコンセントを得て採取した。

2 . ELISA 法による CMV 血清型の判定

CMV 血清型別判定には、CMV に対する免疫反応の主要なターゲットである糖タンパク H : glycoprotein H (gH) のエピトープを抗原とした ELISA 法を用いた。gH は CMV エンベロープ上の糖タンパクであり、ウイルスの細胞への吸着を担っている。CMV AD169 株と Towne 株のエピトープ領域

をオリゴヌクレオチド合成により作製し、pGEX-5x プラスミド(Amersham Bioscience) に組み込んだ。作製プラスミドを大腸菌にトランスフェクションし、GST 融合タンパクとしてエピトープを発現させた。発現タンパクは GST カラムを用いて精製後、96 穴プレートに固相化して ELISA 系を作成した。検体として感染児・母親の希釈血漿を使用し、検出系には HRP 標識抗ヒト IgG 抗体、ELISA POD Substrate ABST キット(Nakarai) を用いた。吸光度測定によって抗体の有無を判定した。また市販のキット・エンザイグノストサイトメガロ/IgG (または IgM) (SIEMENS) により、抗 CMV IgG、IgM 抗体の有無も検討した。IgG avidity は日南病院疾病制御研究所・峰松俊夫先生に依頼した。

3 . リアルタイム PCR 法による感染 CMV 型判定

先天性 CMV 感染児の尿より QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。DNA、型共通な gH 領域プライマー、型特異的な TaqMan プローブを TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosciences) と混和し、StepOne plus real-time PCR system (Applied Biosciences) によりリアルタイム PCR を行うことにより、検体中の CMV DNA を型別定量検出した。TaqMan プローブの 5' 末端は AD169 型を FAM、Towne 型を VIC 標識し、3' 末端には MGB を用いた。

C . 研究結果

新生児尿のスクリーニングにおいて CMV が検出された症例のうち母児ともに血漿

の得られた 18 例を対象とした。CMV 型判定の結果は別表のとおりである（*印は顕性感染、2 例）。母親における CMV IgM は 10 例で陽性/疑陽性であり、IgG avidity 低値は 1 例であった。CMV IgG は 12 例で母児ともに AD169 型、4 例で Towne 型であり、感染児尿中の CMV 型は血清型に一致した。母児ともに両型の例（#13）と、母のみ両型で感染児は Towne 型のみの例（#14）がそれぞれ 1 例ずつ認められた。感染児尿中の CMV 型は #13 で AD169 型、#14 で Towne 型であった。尿中に両型を排泄する例は認められなかった。

D . 考察

先天性 CMV 感染において CMV IgG が母子ともに同型であるのは、新生児で母親の移行抗体が検出されているためである。#13 では母児ともに両型の CMV IgG が認められたが、感染児において出生 1 か月以降は Towne 型抗体が消失し AD169 型抗体のみが継続して検出された。児尿中には AD169 型のみが排泄されていたことから、妊娠中に AD169 型が重感染または再活性化したことが示唆される。同様に #14 では母親に両型、感染児に Towne 型のみの CMV IgG が認められ、感染児尿からは Towne 型のみが検出された。妊娠中の Towne 型重感染または再活性化と考えられる。今回の 18 例中で症候性感染は 2 例のみであり、重感染と疾患重症度との関係は解析できなかったが、頻度は小さいながらも、重感染による先天性 CMV 感染の存在が明確に証明された。

我々の方法で判別できる CMV の型分けの精度では初感染または再活性化が 89%、重感染が 11%である。また母親における CMV

IgM が陽性/疑陽性であった 10 例のうち重感染（#13）を除く 9 例では、妊娠中の CMV 初感染が疑われる。従来から言われるとおり、先天性 CMV 感染の多くは重感染でなく初感染によるものが多いと推測できる。しかし IgG avidity 低値はこのうち 1 例のみである。今回の検討は出産時の血液であり、初感染であっても既に IgM 消失や IgG avidity が高まっている可能性が否定できない。妊娠中の IgM 検査または IgG avidity 検査によって CMV 初感染を同定することができれば、先天性 CMV 感染の多くを早期に発見することができ、速やかな治療的介入が可能となることが期待される。

E . 結論

先天性 CMV 感染児 18 例について児と母親の抗体検査を行った。その結果、9 例は妊娠中の初感染である可能性（IgM 陽性または疑陽性、かつ片型感染）があり、重感染は 2 例であった。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Ishioka K, Sato Y, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T.

Serological analysis of cytomegalovirus (CMV) subtypes in Japanese healthy pregnant women, mothers and neonates with congenital

CMV infection

J Clin Virol 2013 58(2):474-478.

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

2 . 学会発表

- 1) 生田和史、峰松俊夫、井上直樹、久保隆彦、浅野仁覚、石橋 啓、今村 孝、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、藤原成悦、古谷野伸、錫谷達夫
先天性サイトメガロウイルス感染におけるウイルス型の解析
第 439 回福島医学会学術研究集会
福島 2013.5.23
- 2) 生田和史、峰松俊夫、石岡 賢、佐藤友香、石橋 啓、浅野仁覚、今村 孝、藤原成悦、久保隆彦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫
先天性サイトメガロウイルス感染におけるウイルス血清型・DNA 型の解析
第 67 回日本細菌学会東北支部総会
仙台 2013.8.30-31
- 3) 生田和史、峰松俊夫、石岡 賢、佐藤友香、石橋 啓、今村 孝、藤原成悦、久保隆彦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫
サイトメガロウイルス血清型・DNA 型に基づく先天感染例の検討
第 61 回日本ウイルス学会
神戸 2013.11.10-12

片型感染 (AD169)

症例		IgG			IgM	IgG avidity (%)	新生児尿中のCMV型
		CMV	AD	To	CMV		
1	母親	+	+	-	+	47.7 (中)	AD
	新生児	+	+	-	-		
2*	母親	+	+	-	+	85.7 (高)	AD
	新生児	+	+	-	+		
3	母親	+	+	-	+	56.1 (高)	AD
	新生児	+	+	-	-		
4	母親	+	+	-	+	22.8 (低)	AD
	新生児	+	+	-	+/-		
5*	母親	+	+	-	+/-	81.4 (高)	AD
	新生児	+	+	-	+		
6	母親	+	+	-	+/-	77.6 (高)	AD
	新生児	+	+	-	-		
7	母親	+	+	-	+/-	80.2 (高)	AD
	新生児	+	+	-	-		
8	母親	+	+	-	-	56.6 (高)	AD
	新生児	+	+	-	+		
9	母親	+	+	-	-	74.1 (高)	AD
	新生児	+	+	-	-		
10	母親	+	+	-	+/-	41.2 (中)	AD
	新生児	+	+	-	+		
11	母親	+	-	-	-	60.2 (高)	AD
	新生児	+	-	-	-		
12	母親	+	+	-	-	63.0 (高)	AD
	新生児	+	-	-	-		

重感染 (AD169 & Towne)

13	母親	+	+	+	+/-	88.9 (高)	AD
	新生児	+	+	+	-		
14	母親	+	+	+	-	72.4 (高)	To
	新生児	+	-	+	-		

片型感染 (Towne)

15	母親	+	-	+	+/-	63.5 (中)	To
	新生児	+	-	+	+/-		
16	母親	+	-	+	-	73.8 (高)	To
	新生児	+	-	+	-		
17	母親	+	-	+	-	68.9 (高)	To
	新生児	+	-	+	+/-		
18	母親	+	-	+	-	70.7 (高)	To
	新生児	+	-	+	+		

表1. 先天性CMV感染におけるCMV血清型別抗体・IgM・IgG avidityの検と新生児尿中に排泄されるCMV型の判定

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T.	Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers.	J Clin Virol	58	474-478.	2013

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤事業）
分担研究報告書

先天性CMV感染症診断サービスの構築

研究分担者 木村 宏 名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学 教授

研究要旨

先天性 CMV 感染実態解明のためには、感染症児レジストリ（登録制度）を確立し、前方視的に患者を長期にフォローアップすることが望ましい。また、多数の患者を登録するためには、中央診断により無償で先天性 CMV 感染症を診断するシステムを構築する必要がある。今回我々は、先天性 CMV 感染の診断法を標準化し、広く臨床医がアクセスできる先天性 CMV 感染症診断サービスの構築を試みた。本診断サービスは次年度開始される CMV 感染症児レジストリの運用と有効利用に大きく寄与するものと考えられる。

A . 研究目的

先天性・周産期感染症はいわゆる TORCH 症候群と称され、胎内感染や周産期の母子垂直・水平感染により、重篤な後遺症を残しうる疾患群である。この TORCH 症候群の中でも、わが国で最も頻度が高く、疾病負担が大きいのが先天性 CMV 感染症である。古谷野らによる前方視調査により、我が国における先天性 CMV 感染は 1 人/300 出生と頻度が高く、年間 1000 例近くの症候性患者が出生していると推測されている（Koyano S, BMC open 2011）。一方で、後方視的に行った全国調査によれば、先天性 CMV 感染症は 10 万出生あたり 9.5 人であり、出生数を元に換算すると、我が国では年間約 100 例の先天性 CMV 感染症児が診断されているに過ぎない（Torii Y, Pediatr Infect Dis J 2013）。この乖離は、極めて多数の症候性 CMV 感染症児が見過ごされていることによると考えられるが、詳細は不明である。先天性 CMV 感染症の予防戦略を再構築し、標準的治療法の確立と普及を目指すためには、わが国における現在の実態を把握すること

が不可欠である。

先天性 CMV 感染実態解明のためには、感染症児レジストリ（登録制度）を確立し、前方視的に患者を長期にフォローアップすることが望ましい。患者登録に際しては、先天性 CMV 感染を確実にかつ迅速に診断する必要がある。先天性 CMV 感染診断には生後 3 週以内の尿からの CMV-DNA 検出が最も侵襲が少なくかつ信頼できる。この目的のため、PCR 法などによる核酸増幅法が用いられているが、これらの検査法は特殊な技術・機器を必要とする上に、健保不採用であるため、広く臨床で実施されるには至っていない。多数の患者をレジストリに加えるためには、中央診断により無償で先天性 CMV 感染症を診断するシステムを構築する必要がある。

今回我々は、先天性 CMV 感染症児レジストリの確立を目指して、先天性 CMV 感染の診断法を標準化し、広く臨床医がアクセスできる先天性 CMV 感染症診断サービスの構築を試みた。

B. 研究方法

1) 先天性 CMV 感染の診断法の標準化

National Institute for biological Standards and Control から購入した国際標準物質 (HCMV Merlin 株の凍結乾燥製剤) を、CMV DNA が検出されないヒト尿に希釈し、DNA 抽出した後、リアルタイム PCR 法を用いて CMV DNA 定量を行った (Wada, J Clin Microbiol, 2007)。各サンプルを duplicate で測定し、計 4 回の測定結果を平均した。この検討より、臨床検体の測定結果を「IU (国際単位)」表記とした。続いて、先天性 CMV 感染症と過去に診断されている患者の尿を用い、リアルタイム PCR 法にて CMV DNA を測定した。対照に血清学的に CMV 未感染の乳児の尿を用いた。

2) 先天性 CMV 感染症診断サービスの構築:

分担研究施設 (東京大学小児科、岡明; 旭川医科大学小児科、古谷野伸; 神戸大学小児科、森岡一朗; 藤田保健衛生大学小児科、吉川哲史; 長崎大学小児科、森内浩幸) と共同で、先天性 CMV 感染症診断サービスの流れ、患者該当基準、運用方法を協議・作成した。

(倫理面への配慮)

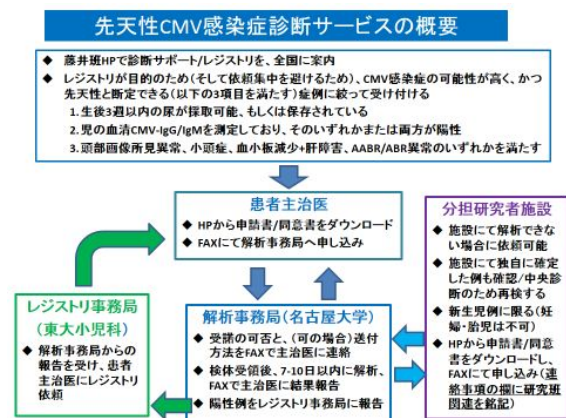
本研究はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、個人情報管理に万全を期して実施する。検査の実施に当たっては、文書による説明および同意を取る。また、研究の公開、個人情報の保護など臨床研究に関する倫理指針を遵守する。患者の匿名化により患者に不利益が及ぶ可能性を排除する。患者の人権擁護、個人情報の保護、データベースの機密性等については特に注意を払いこれを保証する。本研究は、名古屋大学附属病院の倫理委員会にて、実施承認された。

C. 研究結果

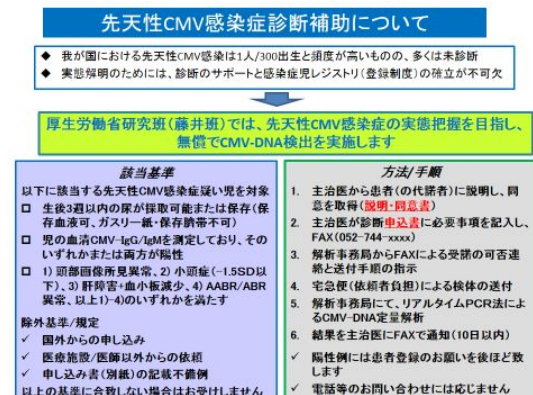
1) 先天性 CMV 感染診断法の確立と標準化: 自施設の系を国際標準物質でキャリブレーションした結果、CMV DNA 量は 1 コピー/mL (自施設) = 2.5 IU/mL であった。先天性 CMV 感染症児の尿から、多量の CMV DNA が検出された。一方、非感染児の尿からは CMV DNA は検出されなかった。

2) 先天性 CMV 感染症診断サービスの構築:

以下に診断サービスの概要(案)を示す。研究班のホームページを通し、診断サービス実施を公開・宣伝する。先天性 CMV 感染症が疑われる児を診察した各主治医は、ホームページから申込書をダウンロードし、FAX にて解析施設である名古屋大学に検査依頼をする。



測定受け入れ患者該当基準は以下の通りとした。本サービスの目的は患者登録であるため、なるべく陽性症例を多く拾えるように該当基準を設定した。



申し込みの際に用いる患者情報シートを

示す。陽性例はレジストリに参加後、更に詳しい情報収集を行うが、診断サービスの段階では限られた情報のみに留めた。

厚生労働省研究班(藤井班) 先天性CMV感染症診断 解析事務局御中
FAX番号 052-744-XXXX

**** 先天性CMV感染症診断 申込書 ****

施設名 _____ 所属名 _____
 施設住所 _____
 主治医名 _____
 FAX番号 _____ (検査受諾の可否・結果をお伝えします)
 電話番号 _____ (申込書に不備があったとき問い合わせます)

患者情報 (下記欄は必須です。記載漏れの場合受諾できないことがあります)
 母妊娠週数 _____ 回妊娠 _____ 回経産 _____ 同胞の数 _____ 人 出産時年齢 _____ 歳
 IUGR (無・有・妊娠 週から) 胎児エコー所見 (_____)
 妊娠中のCMV感染症 (有・無・不明) 有の場合 (初感染・再感染・不明)
 初・再感染の判定根拠 (_____)
 生年月日 _____ 年 _____ 月 _____ 日 (男・女) Apgar score 1分 _____ 点 / 5分 _____ 点
 在胎週数 _____ 週 _____ 日 出生体重 _____ g 身長 _____ cm 頭圍 _____ cm
 日齢 _____ 日 (申請時の日齢)
 先天性CMV感染症を疑う根拠
 CMV-IgM結果 値 (_____) 方法 (_____)
 CMV-IgG結果 値 (_____) 方法 (_____)
 その他のウイルス学的検査結果 (_____)
 頭部画像異常 (例: 石灰化、脳室拡大、脳萎縮、皮質形成異常、白質信号変化等)
 有・無 方法 (_____) 所見 (_____)
 小頭症 (< -1.5SD) 有・無 (_____ SD)
 肝障害 (ALT > 100IU/L) 有・無 (ALT _____ IU/L)
 血小板減少 (< 15万 / mm³) 有・無 値 (_____ / mm³)
 AABR pass: yes / no 未後 refer の場合 (右側・左側・両側) _____
 ABR異常あり・AABR異常なし・未後 所見 (_____)

患者同意 有・無 (同意が無い場合は検査受諾できません)
検体 原則として全尿を提出して頂きます。全尿1mLを採取、冷蔵(4℃)保存してください。
 尿 (全尿) 有・無 採取 (_____ 月 _____ 日、生後 _____ 日) (添・予定) 保存方法 (冷蔵・凍結)
 生後3日を過ぎており、他に保存検体がない場合のみ全血 (ヘパリン血は不可) も受け付けます。
 全血 量 (_____ mL) 採取 (_____ 月 _____ 日、生後 _____ 日) 保存方法 (冷蔵・凍結)

連絡事項 (あれば) _____

以上、相違ありません。 署名 _____

D . 考察

現在、臨床的に先天性 CMV 感染が疑われた症例を確定診断する施設がないことが問題となっている。先天性 CMV 感染症児レジストリへのリクルートはもとより、研究班として相談を受けた場合に中央診断を行い、診断可能な体制を構築することは不可欠である。本年度、我々は先天性 CMV 感染の診断法を標準化し、広く臨床医がアクセスできる先天性 CMV 感染症診断サービスの構築を試みた。また、CMV DNA 定量に、国際単位を導入し、標準化を行った。これらは、次年度開始される CMV 感染症児レジストリの運用と有効利用に大きく寄与するものと考えられる。

CMV 感染症診断サービスについては、目的が患者登録であるため、なるべく陽性症例を多く拾えるように該当基準を設定した。特にハイリスクである先天性難聴児を多く

登録し見落とさないように、該当基準に工夫をこらした。

CMV 先天感染症児レジストリシステムが確立されたなら、感染及び後遺症発生の実態把握が可能となるとともに、医療機関への様々な情報提供に生かすことができるであろう。海外では先天性 CMV 感染症児に高率に合併する難聴に対して、ガンシクロビル / バルガンシクロビルを用いた治療が確立されつつある。わが国においても、一部の施設でガンシクロビル治療が行われているが保険適応なく、標準治療には至っていない。レジストリにより、治療実態の調査も可能となる。更には、先天性 CMV 感染症児の長期予後明らかになるであろう。これらは CMV 先天感染症児に対する治療の適応・治療法の選択に、貴重な情報源となると考えられる。

E . 結論

先天性 CMV 感染症児レジストリの確立を目指して、先天性 CMV 感染の診断法を標準化し、広く臨床医がアクセスできる先天性 CMV 感染症診断サービスの構築を試みた。本診断サービスはレジストリの運用と有効利用に大きく寄与するものと考えられる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Kawada J, Ito Y, Torii Y, Kimura H, Iwata N. Remission of juvenile idiopathic arthritis with primary Epstein-Barr virus infection. Rheumatol 52:956-8 2013
2. Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human herpesvirus 6-associated encephalopathy in a child with Dravet syndrome. Neuropediatrics 44:155-8, 2013
3. Ito Y, Kawamura Y, Iwata S, Kawada J,

- Yoshikawa T, Kimura H. Demonstration of type II latency in T lymphocytes of Epstein-Barr Virus -associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 60: 326-328, 2013
4. Esaki S, Goshima F, Kimura H, Murakami S, Nishiyama Y. Enhanced antitumoral activity of oncolytic herpes simplex virus with gemcitabine using colorectal tumor models. *Int J Cancer* 132:1592-601, 2013
 5. Torii Y, Kimura H, Hayashi K, Suzuki M, Kawada J, Kojima S, Katano Y, Goto H, Ito Y. Causes of vertical transmission of hepatitis B virus under the at-risk prevention strategy in Japan. *Microbiol Immunol* 57:118-21, 2013
 6. Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T. Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol* 87:2120-7, 2013
 7. Isobe Y, Hamano Y, Yoshinori Ito Y, Kimura H, Tsukada N, Sugimoto K, Komatsu N. A monoclonal expansion of Epstein-Barr virus-infected natural killer cells after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Virol* 56:150-2, 2013
 8. Ohta R, Imai M, Kawada J, Kimura H, Ito Y. Interleukin-17A-producing T lymphocytes in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Microbiol Immunol* 57:139-44, 2013
 9. Torii Y, Kimura H, Ito Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H. Clinico-epidemiological states of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 32:699-701, 2013
 10. Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kojima S, Kimura H, Ito Y. Plasma viral MicroRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 208: 771-9, 2013
 11. Sugimoto A, Sato Y, Kanda T, Murata T, Narita Y, Kawashima D, Kimura H, Tsurumi T. Different Distributions of Epstein-Barr virus early and late gene transcripts within viral replication compartments. *J Virol* 87: 6693-9, 2013
 12. Murata T, Iwata S, Siddiquey NA, Kanazawa T, Goshima F, Kimura H, Tsurumi T. Heat shock protein 90 inhibitors repress latent membrane protein 1 (LMP1) expression and proliferation of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lymphoma. *PLoS One* 8:e63566, 2013
 13. Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H. Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan. *Pediatr Int* 55, 566-571, 2013
 14. Suzuki M, Torii Y, Kawada J, Kimura H, Kamei H, Onishi Y, Kaneko K, Ando H, Kiuchi T, Ito Y. Immunogenicity of inactivated seasonal influenza vaccine in adult and pediatric liver transplant recipients over two seasons. *Microbiol Immunol* 57:715-22.2013
 15. Ito Y, Suzuki R, Torii Y, Kawa K, Kikuta A, Kojima S, Kimura H. HLA-A*26 and HLA-B*52 are associated with a risk of developing EBV-associated T/NK lymphoproliferative disease. *Blood e-Letter*

ID: bloodjournal_el; 8085, 2013

16. Kato S, Miyata T, Takata K, Shimada S, Ito Y, Tomita A, Elsayed AA, Takahashi E, Asano N, Kinoshita T, Kimura H, Nakamura S. Epstein-Barr virus-positive cytotoxic T-cell lymphoma followed by chronic active Epstein-Barr virus infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder: a case report. Hum Pathol 44:2849-52, 2013
17. Kimura H, Kawada J, Ito Y. Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies: the expanding spectrum of hematopoietic neoplasms. Nagoya J Med Sci 75: 169-79, 2013

2. 学会発表

1. 木村 宏. 「母子感染」 - 単純ヘルペスウイルス. 第 20 回ヘルペス感染症フォーラム. 札幌. 2013年8月23日
2. Kawano Y, Iwata S, Kawada JI, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kimura H, Ito Y. Circulating Viral MicroRNAs Are Potential Biomarkers for Disease Status in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. The 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA , July 22, 2013
3. Kawada JI, Ito Y, Iwata S, Kawano Y, Kanazawa T, Siddiquey MN, and Kimura H. mTOR inhibitors induce cell cycle arrest and inhibit tumor growth in Epstein-Barr virus-associated T and natural killer cell lymphoma. The 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA , July 22, 2013,

1 . 特許取得

- 1) 特許第 5205609 号. ウイルス検出用オリゴヌクレオチドセット、EBV、CMV 及び HHV- 6 の分析方法及び検出キット. 発明者;**木村 宏**、西山幸廣、和田かおる、久保田直実特許取得日：2013 年 3 月 1 日
- 2) 特許第 5429679 号: ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキット. 発明者;**木村 宏**、西山幸廣. 特許取得日：2013 年 12 月 13 日

2 . 実用新案登録

特になし。

3 . その他

特になし。

G . 知的所有権の取得状況

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Torii Y, Kimura H , Ito Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H.	Clinico-epidemiological states of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan.	<i>Pediatr Infect Dis J</i>	32	699-701	2013
Ito Y, Kimura H , Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H.	Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan.	<i>Pediatr Int</i>	55	566-571	2013

妊婦の抗体測定と胎児超音波診断による先天性サイトメガロウイルス感染症の予後予測

分担研究者 愛泉会日南病院疾病制御研究所 峰松俊夫

研究要旨

現在、先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染の妊娠中の検査として、母体の血清学的検査、胎児検体のウイルス学的検査、胎児の超音波画像検査が実施されている。これらの検査のうち、胎児検体を用いるウイルス学的検査は妊娠に対しての侵襲性が高い。そこで、先天性 CMV 感染症の発症・予後の予想が血清学的診断と胎児超音波検査の組み合わせで可能かを検討した。

出生児 1163 名のうち、胎内 CMV 感染は 5 名（先天性 CMV 感染発生率 0.43%）だった。そのうち症候性感染は 2 名（先天性 CMV 感染症発生率 0.17%）であり、1 名が重症先天性 CMV 感染症と診断され、残りの 1 名が感音性難聴となった。これら症候性感染となった 2 名は、妊娠初期に IgM 抗体陽性、Avidity Index 低値の初感染妊婦から出生しており、重症児は胎児超音波診断においても頭部・腹部超音波異常を示していた。

今回の我々の研究では、抗 CMV IgG 抗体の Avidity Index 測定、IgM 抗体の検出、および胎児超音波診断の所見を総合的に判断すれば、CMV 感染児の予後判断に役立てられる可能性が示唆された。

A 研究目的

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症は、乳幼児に神経学的後遺症を残しうる先天性感染症のうち最も感染頻度が高く、全出生児の 0.3-0.4% が胎内感染を起こしている。

しかし、胎内 CMV 感染を証明しても、必ずしも出生時に児が発症してくるとは限らず、また、出生後しばらくしてから難聴等の中枢神経障害を示すこともあれば、全く障害を示さずに健常児と同様に育つ児もいる。

妊娠初期における妊婦の CMV 抗体スクリーニングは、人工中絶の増加を招く恐れがあるものの、その後の妊娠生活等における教育指導に役立てることもできる。そのためには、妊婦への情報提供へとつながる先天性 CMV 感染症の予後予測が可能な診断法の確立が必要である。

胎内 CMV 感染（症）の診断は、母体の血清学的検査、羊水等の胎児検体を用いたウイルス学的検査、および超音波診断検査が主な

検査法となっている。このうち胎児検体の採取には侵襲を伴い、流産を引き起こすこともある。よって、血清学的検査と超音波検査法の組み合わせで、感染児の予後予測ができれば望ましい。

本研究では先天性 CMV 感染症の発症・予後の予測を可能とできるかを研究の目的として、母体の抗 CMV 抗体測定および胎児超音波診断と出生児の神経学的後遺症の関係を調べた。

B 研究方法

妊婦・胎児・新生児に対する臨床研究は宮崎大学医学部の治験審査委員会の承認を得て、研究協力へのインフォームドコンセントの了承が得られた出生 1163 例を対象として実施した。

実験方法の概要を図 1 に示した。

妊娠初期 8 週から 12 週に母体の血清を採取し、デンカ生研社の EIA キットあるいはシ

ーメンス社のエンザイグノスト B キットを用いた ELISA 法により、キット添付の説明書の方法に従って、抗 CMV IgG 抗体と IgM 抗体を測定した。

IgM 抗体が陽性だった症例では、宮崎大学において詳細な超音波画像診断システムにて胎児の状態を調べ、妊婦家族の希望があれば羊水穿刺を実施し、胎児の CMV 感染の有無を調べた。

抗 CMV IgG 抗体が陽性だった血清は、IgG 抗体の Avidity を測定した。Avidity の測定は Blackburn ら (J. Med. Virol. 33:6-9, 1991) の尿素変性 ELISA 法に準じてインデックス化して表す方法を採用した。ELISA キットはシーメンス社エンザイグノスト B サイトメガロ/IgG キットを用いた。まず、キットそれぞれの使用説明書に記載のように被験者血清を希釈して、ELISA プレートのウェルに添加して抗原と 1 時間反応させた。この際、一検体につき 2 つの抗原ウェルに添加した。抗原との反応終了後、一つの抗原ウェルは抗体変性剤である 8M 尿素を含む PBS-Tween 洗浄液で、もう一つの抗原ウェルは尿素を含まない PBS-Tween 洗浄液でウェルを洗浄した。その後は添付説明書の通りに、標識抗体の添加、基質液を添加させて吸光度を測定した。8M 尿素を含む洗浄液で洗浄したウェルの吸光度を尿素を含まない洗浄液で洗浄したウェルの吸光度を除算し、その百分率を Avidity Index (AI) として表した。

妊娠初期に抗 CMV IgM 抗体が陰性だった妊娠例については、妊婦健診において通常スケジュールの胎児超音波診断を実施することとした。

また、妊娠初期に IgG 抗体が陰性だった妊婦は、妊娠中期および後期にも初期と同様に抗 CMV IgG 抗体と IgM 抗体を測定した。その中で妊娠経過中に IgG 抗体陽転を示した症例については、妊娠中の初感染とみなし、宮崎大学において胎児の超音波検査を詳細に実施した。

児の出生後は、出生 1 週間以内の新生児尿を検体として、CMV 遺伝子の有無を調べた。尿中 DNA をヨウ素沈殿法にて分離・精製し、PCR にて CMV の前初期抗原遺伝子領域およ

び pp71 後期遺伝子領域を増幅し、アガロースゲル電気泳動法で増幅 DNA の確認を行った。

尿中から CMV 核酸が増幅検出された先天性 CMV 感染児については、眼底網膜検査や聴性脳幹反応 (ABR) 検査等を実施して、中枢神経障害等の発症の有無を出生後 3 年間追跡調査した。

C . 研究結果

研究結果の概要を図 2 に示した。

出生数 1163 例を研究対象とし、妊娠初期の抗 CMV IgG 抗体と IgM 抗体検査を 10.8±2.2 週で実施した。

妊娠初期の妊婦の CMV 抗体陰性率は 16.7% (194/1163) であり、妊婦の CMV 既感染率は 83.3% (969/1163) であった。IgM 抗体陽性者は全数の 3.4% (40/1163) だった。IgM 抗体陽性者はすべて IgG 抗体陽性でもあり、IgG 抗体陽性妊婦の IgM 抗体陽性率は 4.1% (40/969) であった。IgG 抗体陰性で IgM 抗体陽性の妊婦は確認できなかったことから、今回の研究において感染極初期の妊婦はいなかったと判断した。

IgG 抗体陽性妊婦について、IgG 抗体の AI を測定したところ、AI 35%未満の低値を認められたのは、IgM 抗体陽性者では 22.5% (9/40)、IgM 抗体陰性者では 7.4% (69/929) であった

出生児の尿から CMV DNA を検出して先天性 CMV 感染の調べた結果、出生児の 5 名が陽性であり、先天性 CMV 感染率は 0.43% (5/1163) であった。

感染児 5 名のうち 2 名が先天性 CMV 感染症として発症していた。そのうち重症型の 1 名は超音波診断において異常像 (脳室拡大、腸管高輝度エコー像、羊水過少) を示していた。また、その母親は妊娠初期に IgM 抗体陽性で、IgG 抗体 AI も低値であり、CMV 初感染妊婦からの出生と判断した。

発症した残り 1 名は出生後に難聴症状を示し、AI 低値から、初感染妊婦からの出生と判断した。

感染は成立したが、発症しなかった 3 名のうち 2 名は IgG 抗体 AI 高値の妊婦からの出生であり、既感染妊婦において、妊婦が

CMV 重感染あるいは再活性化による回帰感染を起こして胎児に感染したものと判断した。

無症状で経過した児 1 名は妊娠中に抗体陽転した妊婦、すなわち妊娠中後期での初感染妊婦からの出生であった。

D. 考察

宮崎県において 2000 年ごろの妊婦の CMV 抗体陽性率は 90% を超えていたが、今回の研究では妊婦の CMV 抗体陽性率は 83.3% であった。全国平均ほどではなくても、宮崎県においても最近の妊婦の CMV 抗体陽性率の減少が認められた。

ところで、CMV 感染の初期には CMV 抗原に対して低結合力 (low-avidity) の IgG 抗体が産生され、感染の経過にしたがって、しだいに高結合力 (high-avidity) IgG 抗体が産生されることが知られている (Blackburn, N.K. et al.: J. Med. Virol. 33:6-9, 1991)。すなわち、Avidity Index (AI) を測定して、それが低値のものほど感染初期、AI が高値であれば感染から時間が経過した既感染者であると判断できる。妊娠初期の 12 週までに CMV 感染すれば重症 CMV 感染症児が出生しやすいことが知られており、妊婦の感染時期を推定することは先天性 CMV 感染症の成り行きを考慮する上で重要な情報である。そこで、抗 CMV IgG 抗体および IgM 抗体の検出に加えて、妊婦の抗 CMV 抗体の avidity の測定が先天性 CMV 感染症における予後の判断に利用可能かを本研究では重点的に検討することにした。

AI 測定値から感染児の予後を検討したところ (表 1)、AI35% 未満の低 AI 妊婦において、すなわち CMV 初感染妊婦において、症候性の先天性 CMV 感染が有意に高い確率で発生していた。

また、重症となった先天性 CMV 感染症児は、中枢性麻痺、発達遅滞、両側聴神経障害を認めたが、胎児の胎児超音波診断においても頭腹部の異常像を認めていた。超音波画像診断での異常所見は、児の予後を予測する上での判断材料となりうると思われた。

今回の我々の研究では、IgG 抗体の Avidity Index の測定、IgM 抗体の検出、および胎児超音波診断を組み合わせることで、CMV 感

染児の予後判断に役立てることが可能と考えられた。

E. 結論

1) 妊婦の抗 CMV IgG 抗体陽性率 (CMV 感染率) は 83.32% (969 名/1163 名中)、そのうちの 4.13% (40 名/969 名中) が IgM 抗体陽性であった。

2) 妊娠初期に CMV IgG 抗体陰性者 194 名中の 1 名が妊娠中に IgG 抗体陽性となり、妊娠中の抗体陽転率は 0.51% であった。

3) 出生児 1163 名のうち、胎内 CMV 感染は 5 名 (先天性 CMV 感染発生率 0.43%) だった。そのうち症候性感染は 2 名 (先天性 CMV 感染症発生率 0.17%) であり、1 名が重症先天性 CMV 感染症と診断され、残りの 1 名が感音性難聴となった。

4) 本研究において先天性 CMV 感染症は、妊娠早期において母体血清が抗 CMV IgM 抗体陽性かつ抗 CMV IgG 抗体が低 AI だった妊婦からの出生児に認められた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kazufumi Ikuta, Toshio Minematsu, Naoki Inoue, Takahiko Kubo, Kimisato Asano, Kei Ishibashi, Takashi Imamura, Hidetaka Nakai, Tetsushi Yoshikawa, Hiroyuki Moriuchi, Shigeyoshi Fujiwara, Shin Koyano, Tatsuo Suzutani: Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers. J Clin Virol. 58(2): 474-478, 2013.
- 2) Matsuo K, Morioka I, Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, Inoue N, Yamada H, Iijima K.: Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed

tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection.

Brain Dev. 36 : 10-15 , 2014.

2. 学会発表

- 1) 長又哲史、蝦名康彦、平久進也、谷村憲司、森岡一郎、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：効果的な妊婦 CMV スクリーニング法の確立を目指して
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、2013、5、札幌
- 2) 森上聡子、蝦名康彦、平久進也、谷村憲司、森岡一郎、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：母体血サイトメガロウイルス IgG avidity 測定による先天性感染症の発症予知
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、2013、5、札幌
- 3) 蝦名康彦、平久進也、長又哲史、森上聡子、谷村憲司、出口雅士、森岡一郎、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：IgG avidity 測定による先天性サイトメガロウイルス感染の発生予知
第 28 回ヘルペスウイルス研究会、2013、5、淡路市
- 4) Yasuhiko Ebina, Ayako Sonoyama, Ichiro Morioka, Kenji Tanimura, Shinya Tairaku, Toshio Minematsu, and Hideto Yamada : Diagnostic value of IgG Avidity of pregnant women for the prediction of congenital cytomegalovirus infection.
17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, 2013, June, Lisbon
- 5) 長又哲史、蝦名康彦、峰松俊夫：効果的な CMV スクリーニング法の確立を目指して。
第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013、6、倉敷
- 6) 蝦名康彦、長又哲史、峰松俊夫：母体血サイトメガロウイルス IgG avidity 測定による先天性感染の発症予知。
第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013、6、倉敷
- 7) 生田和史、峰松俊夫、石岡 賢、佐藤友香、石橋 啓、浅野仁寛、今村孝、藤原成悦、久保隆彦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫：先天性サイトメガロウイルス感染におけるウイルス血清型・DNA 型の解析
第 67 回日本細菌学会 東北支部総会、2013、8、仙台
- 8) 峰松俊夫：先天性サイトメガロウイルス感染症における IgG 抗体の Avidity 測定法
第 18 回日本神経感染症学会、2013、10、宮崎
- 9) 峰松俊夫：先天性サイトメガロウイルス感染症対策のための検査と診断法
第 19 回三重県生涯教育特別研修セミナー、2013、10、津
- 10) 金子政時、山下理絵、村岡純輔、鈴木智幸、小玉由紀、鮫島浩、池ノ上克、峰松俊夫：体内サイトメガロウイルス感染症の母体スクリーニングにおける IgG avidity の有用性
第 58 回に本未熟児新生児学会学術集会、2013、11-12、石川
- 11) 鳥谷部邦明、池田智明、池尻誠、森川文博、三井栄、村田博昭、菅秀、藤澤隆夫、庵原俊昭、増田佐和子、峰松俊夫：臨床研究「三重県の妊婦におけるサイトメガロウイルス感染に関する研究」について平成 25 年度新生児聴覚スクリーニングに関する研究会、2014、2、津

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

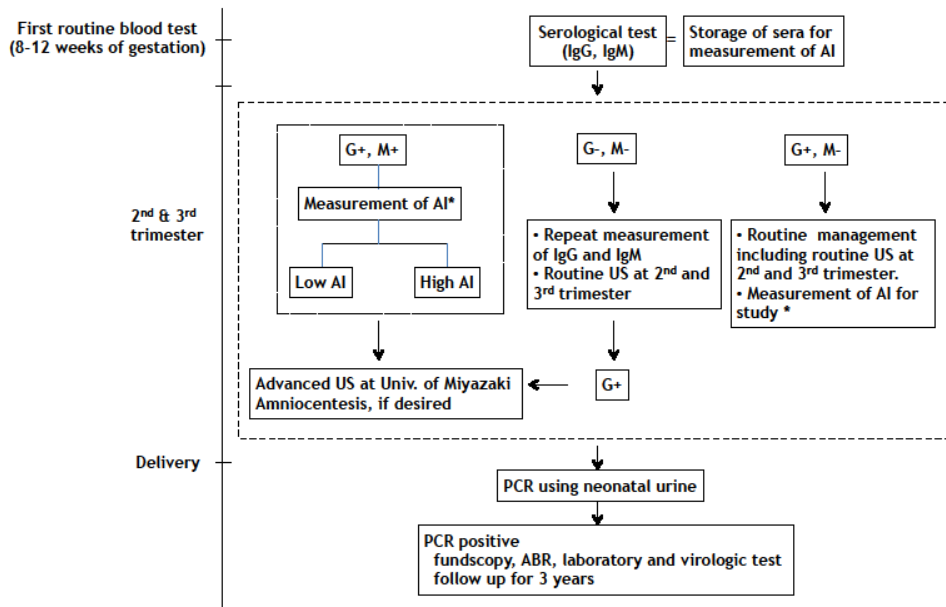


図1 研究方法の概略 (詳細は本文参照)

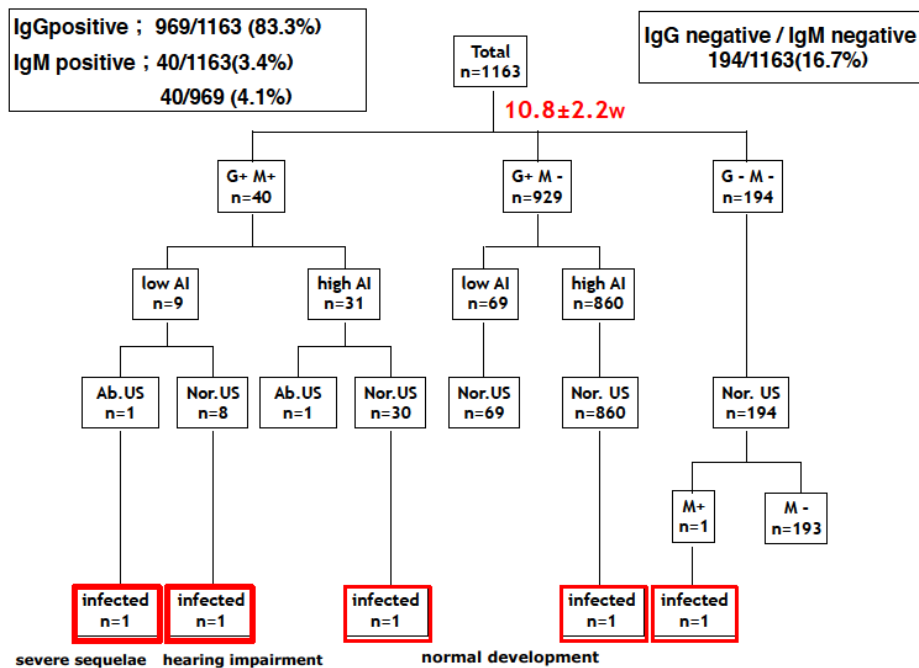


図2 研究結果概要 (先天性CMV感染率 0.43% (5/1163))

表 1. 抗CMV IgG抗体Avidity Index に基づく IgM抗体陽性、胎児感染、後遺症の発生数

IgG AI (%)	Number of Cases	Positive IgM antibody (n)	Infection (n)	Sequelae (n)
0 < - < 35	79	10	3	2
35 - < 50	130	6	0	0
50 - < 70	301	15	1	0
70 - 100	460	10	1	0

AI; avidity index , *; p <0.01
抗体陽性例を含む検討.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikuta K, <u>Minematsu T</u> , Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T.	Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers.	J Clin Virol	58	474-478.	2013

母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究

分担研究報告書

症候性先天性サイトメガロウイルス感染児への抗ウイルス療法の検討

研究分担者 森内 浩幸（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・小児科）

研究要旨

長崎県で2013年1-12月にヒトT細胞白血病ウイルスI型（HTLV-1）キャリアから生まれた3歳以降の児の追跡調査を行った。2010年には119名の妊婦がキャリアと同定されていたが、今回追跡調査できた児はその他の年齢も含めて13名のみだった。PA法陽性例が1例（母乳栄養児）あったが、確認検査を実施しないまま結果を説明していることが判明し、プロトコールが遵守できていない問題が浮かび上がった。

A．研究背景・目的

ガンシクロビルによる抗ウイルス療法によって、症候性先天性CMV感染児の聴力（Kimberlin et al, J Pediatr. 2003; 143: 16-25）および精神運動発達（Oliver et al, J Clin Virol 2009; 46: S22-6）の予後の改善が期待できる。しかし6週間に及ぶ経静脈的治療は、患者・家族のQOLの低下に加えて、医療経済的負担も大きい。プロドラッグであるバルガンシクロビルの経口投与であれば外来加療も可能であるが（Kimberlin et al, 2008; 197: 836-45）、乳児に投与するための剤形はなく、その有効性や安全性に関するエビデンスは十分ではない。

B．研究方法

厚生労働科学研究費・古谷野班の成果の一つとして発表した「先天性CMV感染治療プロトコール」（森内浩幸. 小児感染免疫 2010; 22: 385-9）に沿って加療された例、特にバルガンシクロビルによる治療例において、そのウイルス学的効果、臨床的効果、副作用の有無、血中濃度のデータをまとめた。

ウイルス学的効果判定には、全血中および尿中のCMVゲノムコピー数をreal-time PCRに

より定量した。

ガンシクロビル血中濃度の測定は、バルガンシクロビル投与開始5-7日の時点で実施した。投与後30分、90分、6時間、そして11時間の4点での採血を基本としたが、外来患者などで実施困難な場合は投与後90分と11時間の2点で採血した。液体クロマトグラフィー/タンデムマススペクトロメトリー法による測定は、田辺R&Dサービス分析化学部に依頼した。

（倫理面への配慮）

本研究は、長崎大学病院臨床研究倫理委員会および関連病院における倫理委員会で審査され承認を受けている。研究協力者には口頭と文書で説明し、文書で同意を得ている。

C．研究結果

1. 自験例8名の成績

表1にバルガンシクロビルによる抗ウイルス療法を行い、その後半年以上の追跡調査が出来ている8例についてまとめた。

8例中3例において副作用（好中球減少）のため休薬が必要となったが、それ以外の副作用は認めなかった。

薬剤血中濃度に関しては、概ね期待通りの

Cmax 値が得られた一方でトラフ値のバラツキは大きかった。

ウイルス学的には 7 例でウイルス血症の消失が速やかに認められたが、1 例ではウイルス血症の軽減を認めたものの消失には至らなかった。

当初から聴力障害が認められていた 5 例も、聴力障害が認められていなかった 3 例も追跡調査の最終時点では治療開始時と比べほぼ不変（増悪は認めない）であった。1 例は投与中に聴力の改善が認められたものの、投与終了後に徐々に元のレベルに戻った。

2. 他施設例を含めた解析

全国の多くの施設でもバルガンシクロビルによる抗ウイルス療法が実施された。ウイルス学的効果が確認された 41 例中 36 例はウイルス血症の消失、5 例ではウイルス血症の軽減化を認めた。

規定の投与量・投与間隔に基づいてバルガンシクロビルの経口投与が行われた 48 例において、投与後 90 分のピーク値は平均 3.3 µg/mL であったが、0.715 ~ 6.849 µg/mL と症例によって大きく異なっていた（図 1）。

確認された中で一過性の好中球減少以外の副作用は認められなかった。

D . 考察

バルガンシクロビル投与は殆どの場合でウイルス学的に著効が認められ、問題となるような短期的副作用は生じなかった。血中濃度が症例毎に大きくばらついた理由は不明であり、施設間で調剤方法や投与法に差違がなかったか検討していきたい。

また、バルガンシクロビル投与 6 週間と 6 か月とで有効性と安全性を比較検討した最近の研究において、後者は前者と比べ聴覚や発達の予後が有意に改善しており、副作用において大差なかったと報告されている。今後は 6 か月投与

もオプションに加えて検討を重ねる必要がある。

E . 結論

バルガンシクロビル投与は先天性 CMV 感染症に対する治療法として有効であり、短期的には安全に実施できた。しかし長期的な副作用の問題は今後もモニターしていく必要があり、また血中濃度のバラツキに関する検討も必要である。

F . 研究発表

1. 論文発表

Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T: Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers. *J Clin Virol* 58(2):474-478, 2013

Koyano S, Inoue N, Nagamori T, Moriuchi H, Azuma H: Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 98(2):F182, 2013.

Torii Y, Kimura H, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H; for the Japanese Society for Pediatric Infectious Diseases. Clinicoepidemiologic status of mother-to-child infections: A nationwide survey in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 32(6):699-701, 2013.

Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Narita A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi; for the Japanese Society for Pediatric Infectious Diseases. Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and

neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan. *Pediatr Int* 55: 566-71, 2013.

森内浩幸：教育講演 鷓の目鷹の目、フクロウの目 サイトメガロウイルスを見逃すな！日本未熟児新生児学会雑誌 25: 7-12, 2013.

森内浩幸：特集 いま知りたい！母子感染対策トキソプラズマ, サイトメガロウイルスを中心に 予防対策の基本 特にトキソプラズマ, サイトメガロウイルスの注意点. *助産雑誌* 67(7):530-538, 2013.

森内浩幸： . 先天性・母子感染症 TORCH 症候群 . *日本臨牀 別冊新領域別症候群シリーズ* 感染症症候群 NO.25 (第2版) 下: 659-668, 2013.

森内浩幸： . 先天性・母子感染症 先天性サイトメガロウイルス感染症 . *日本臨牀 別冊新領域別症候群シリーズ* 感染症症候群 NO.25 (第2版) 下: 679-685, 2013.

森内浩幸：先天性サイトメガロウイルス感染症 . (黒崎知道, 田原卓浩 (編): *プライマリ・ケアの感染症 身近な疑問に答える Q&A*: 168-169, 2013.

2. 学会発表

Sakamoto et al, Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infections in children with autistic spectrum disorders by using preserved dried umbilical cord or dried blood spot samples. *Pediatric Academic*

Societies Annual Meeting. Washington DC, USA. May 4-7, 2013.

石橋麻奈美ら. 先天性サイトメガロウイルス感染症に対する valganciclovir 治療の有効性と安全性の検討. 第49回日本周産期・新生児医学会学術集会. 横浜. 2013年7月14-16日.

G . 知的所有権の取得状況

該当なし。

表 1. バルガンシクロビル療法を実施した自験例のまとめ

VGCV投与後の経過 (半年以上追跡調査できた自験例)								
症例	1	2	3	4	5	6	7	8
治療期間 *休薬を要した	6週	5週*	6週	6週*	6週	6週*	6週	6週
Cmax	-	2.552	4.09	2.845	2.273	3.347	2.922	3.002
Trough値	-	0.152	0.831	1.12	0.167	<0.1	0.885	0.767
副反応	なし	好中球減少	なし	好中球減少	なし	好中球減少	なし	なし
ウイルス学的反応	有効	有効	有効	有効	有効	やや有効	有効	有効
終了後のリバウンド	なし	なし	なし	あり	あり	あり	なし	なし
臨床的なリバウンド	なし	なし	なし	眼底所見の悪化	なし	なし	なし	なし
現在	4Y8M	3Y5M	2Y9M	1Y8M	1Y5M	9M	9M	9M
精神運動発達遅滞	軽度	なし	軽度 (Down症)	中等度	軽度	なし	なし	なし
難聴の有無と治療後の変化	右側・不変	右側・不変	なし・不変	左側・不変	両側・不変	両側・不変	なし・不変	なし・不変

図 1. バルガンシクロビル療法を実施した自験例と他施設例のまとめ

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
森内浩幸	先天性サイトメガロウイルス感染症.	黒崎知道, 田原卓浩	総合小児医療：プライマリ・ケアの感染症 身近な疑問に答える Q&A	中山書店	東京都	2013	168-169

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, <u>Moriuchi H</u> , Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T.	Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers.	J Clin Virol.	58	474-478.	2013
<u>Koyano S, Inoue N</u> , Nagamori T, Moriuchi H, Azuma H.	Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding.	Arch Dis Child Fetal	98	F182	2013
Torii Y, Kimura H, Ito Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H.	Clinico-epidemiological states of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan.	Pediatr Infect Dis J	32	699-701	2013

Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H	Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan.	Pediatr Int	55	566-571	2013
森内浩幸	教育講演 鶏の目鷹の目、フクロウの目ーサイトメガロウイルスを見逃すな！	日本未熟児新生児学会雑誌	25	7-12	2013
森内浩幸	特集 いま知りたい！母子感染対策トキソプラズマ，サイトメガロウイルスを中心に 予防対策の基本 特にトキソプラズマ，サイトメガロウイルスの注意点を．	助産雑誌	67	5630-538	2013
森内浩幸	．先天性・母子感染症 TORCH症候群．NO.25（第2版）下	日本臨牀別冊新領域別症候群シリーズ感染症症候群	25（第2版）下	659-668	2013
森内浩幸	．先天性・母子感染症 先天性サイトメガロウイルス感染症．	日本臨牀別冊新領域別症候群シリーズ感染症症候群	25（第2版）下	679-685	2013

厚生労働科学研究費補助金
(平成 25 年度 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)
(分担) 研究報告書

母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究
尿からの CMV DNA 直接検出に関する基礎検討：real-time PCR 法と LAMP 法の比較

(分担) 研究者 吉川 哲史 藤田保健衛生大学医学部、教授

研究要旨

サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus: CMV) についての、診断、治療に関する技術開発ならびに実際の臨床応用に向けた橋渡し研究を行うことを目的として以下の検討を行った。先行する藤枝班、山田班の研究期間中に先天性 CMV 感染と診断された患児 11 名ならびに同胞 1 名から採取した尿 18 検体を用いて (患児保護者からの同意取得済み) QIAamp DNA blood mini kit を使用して DNA 抽出した場合と、尿を直接検体として使用した場合で、real-time PCR 法と LAMP 法での CMV DNA 検出について解析した。その結果、予想通り LAMP 法では CMV DNA 陽性となっても、real-time PCR 法では陰性となる検体がみられた。よって、LAMP 法は尿から DNA 抽出することなく直接 CMV DNA 検出が可能で、先天性 CMV 感染の迅速かつ簡便な診断法となりえると思われた。

A. 研究目的

TORCH 症候群 (トキソプラズマ、風疹、サイトメガロウイルス、ヘルペスの母子感染により発症する小児先天性疾患の総称) をはじめとした母子感染症は、中枢神経系、聴覚系、視覚系など多岐に渡る重篤な後遺症を来し、患児の生涯にわたり重大な問題となる。こうした後遺症は早期介入・治療により予後改善が可能であることが示されており、今後、予防、診断、治療の包括的な母子感染医療体制の構築が求められている。母子感染については研究レベルで新たな診断や治療技術が開発されてきているが、我が国の臨床医療技術としては導入されておらず、医療現場での混乱を来している。我々の施設では、特に頻度が高いサイトメガロウイルス (Cytomegalovirus: CMV) についての、診断、治療に関する技術開発ならびに実際の臨床応用に向けた橋渡し研究を行う。

B. 研究方法

A. 新生児 CMV 診断開発と中央検査体制

CMV 感染症の DNA 診断技術の体外診断用医薬品化に向けた開発：

(i) 前向き研究：実際に 1-3 歳の正常コントロール児 (肺炎・喘息等にて当院へ入院した患児) より尿・血液を採取して (通常診療)、血清学検査 (通常診療) を実施。採取血清、匿名化した臨床情報を当該施設へ送り、のちに得られた CMV DNA 検出 (研究行為) の結果との比較検討を行う。当院では検体採取し、臨床情報とともに

に藤田保健衛生大学で連結可能匿名化した後に、国立感染症研究所 (感染研)、岐阜薬科大学感染制御学研究室、名古屋大学ウイルス学研究室、共同研究企業に送付され CMV DNA 検出を行う。

(ii) 後向き研究：先天性 CMV 感染は頻度の少ない疾患であり、検査法の開発に十分な例数を確保することが困難であるため、先天性感染症例は先行研究班での新生児スクリーニング事業 (当科が該当) での先天感染が診断された児の保存されている保存検体 (尿) を感染研、岐阜薬科大学感染制御学研究室、名古屋大学ウイルス学研究室、共同研究企業に送り、CMV DNA 検出 (研究行為) を行う。

先天性 CMV 感染疑い症例の DNA 診断：
前向き研究：国内で先天感染が疑われる場合に検査を受け入れる施設がなく診断できる体制にないため、研究班として相談を受けた場合に Central Laboratory が検査を行い、診断可能な体制を作る。特にハイリスクである先天性難聴児での検査を呼び掛けて早期診断が可能な国内体制を作る。医師より文書により説明を受け保護者が文章にて同意した児の尿・血液を採取し (通常診療) 連結可能匿名化した後、CMV DNA 検出による診断 (研究行為) を行う。本学ならびに本学関連施設で先天性 CMV 感染疑い児が発生した際、あるいは中部地区の医療機関から先天性 CMV 感染疑い症例の相談を受けた場合には、当施設で臨床的問題に対する相談に応じるとともにウイルス学的解析を実施。新規検査法の開発：ウイルス DNA 検査による迅速診

断法について技術開発を行う。これまでの研究成果を基に、先天性CMV患児尿を使った直接LAMP法によるウイルスゲノム迅速検出法の確立を進める。

B. 感染児レジストリ・治療薬開発・コホート調査

前向き研究：感染児レジストリ：CMVとトキソプラズマの先天性感染と診断あるいは可能性が非常に高い児について国内の患者についてのレジストリシステムを作成し、母子感染の実態を把握するとともに、フォローアップを行い実態調査する。本研究班の中で先天感染として診断された児についても、同意を得られた児についてはレジストリに登録し、成長発達、合併症などについてフォローし（通常診療と同時実施の研究行為）、先天感染の病像を明かにする。

前向き研究：先天性CMV感染コホートの予後調査：本邦で行われた先天性CMV感染の新生児スクリーニング検査で診断されたコホート群について、その予後調査を行う（研究行為）。

C. 検体使用なし：CMVとトキソプラズマの母子感染の国内相談体制：

相談指針の作成：妊婦の感染の可能性がある場合に、医療機関からの相談を受けて適切な検査等について情報提供する。

1) 対象となる症例と検体： - () 3歳以下の正常コントロール児（肺炎・喘息等にて当院へ入院した患児）から採取した尿(5ml)、血液(2ml) - () 先行研究時に採取した先天性CMV患児尿(残余量)、 - () 関連施設での先天性CMV感染疑い児の尿(5ml)、血液(2ml)。

2) 期間：倫理委員会承認後～承認から5年後まで。

3) 目標症例数：

前向き研究：新生児・乳児 先天性CMV感染あるいは先天性トキソプラズマ感染が疑われる児（全体予定数年間200例×5年間 合計1000例；内 東大予定数年間50例×5年間 合計250例）特に除外基準なし（すべて倫理的な配慮を必要とする研究参加者（未成年者））
コントロール症例（研究班全体100例）：当院分担当症例は30例

（倫理面の配慮）

以下のような対策を講じ、本学倫理審査委員会で本研究計画を承認申請し、現在 revise を再申請中。

a インフォームドコンセント： - () 3歳以下の正常コントロール児（肺炎・喘息等にて当院へ入院した患児）から採取した尿、血液：患児保護者に書面を用いて説明、同意を

得た後に検体採取する。尚、同意しないことにより診療上の不利益のないことを明示する。

- () 先行研究時に採取した先天性CMV患児尿：本学ならびに関連施設で先天性CMV感染が証明された患児から通常診療として採取された保存尿を用いるため、この場合検査制度管理目的等のために余剰検体が使用されることについての同意を得られている。

- () 関連施設での先天性CMV感染疑い児の尿、血液：患児保護者に通常診療に必要な説明と同意を行った上で検体採取する。その他の研究内容については、ヒトからの検体採取、臨床情報を得るものではなくインフォームドコンセントについては該当しない。

b 個人への利益： - () 研究でのコントロールとしての3歳以下の健康小児、ならびに - () に該当する先行研究時の先天性CMV患児については個人への利益はない。コントロール患者については通常入院時検査の余剰検体を使用するため、対象者へのリスクはなく、不利益も微量な余剰検体採取に伴う極めて限定的なものと考えられる。

c 個人情報の保護については説明文書に記載。当院で採取した検体輸送に際しては、コード番号にて匿名化を図り、対照表を基に研究班班長のみ連結化が可能となるような形をとる。連結可能匿名化により個人情報を保護する。対照表は暗号化した上で、パスワードにて管理されたエクセルファイルにて管理する（研究責任者吉川哲史教授室内で施錠管理されたコンピューター）。検体輸送に際し、検体ラベルにはコード番号のみを記載し、別に保管した対照表を基に個人情報管理者：薬剤部鈴木竜太氏のみ連結化が可能となるような形をとる。中央に集積された検体、臨床情報はすべて、資料提供施設（東京大学を含む）において連結可能匿名化する。東京大学での資料の対応表・符号を付与した資料等の管理場所：東京大学医学部産婦人科生殖免疫研究室、東京大学医学部小児科研究室。責任を持って管理する研究従事者名 藤井知行（産婦人科）、岡明（小児科）。対応表はLANに繋がれていないパスワードロックのかかるスタンドアローンのパソコンに保管し、研究終了後は継続保存の同意が得られた場合を除き、データを削除する。

d. 利益相反：本研究に係る全ての費用は厚生労働科学研究費で支払われる。利益相反はなし。

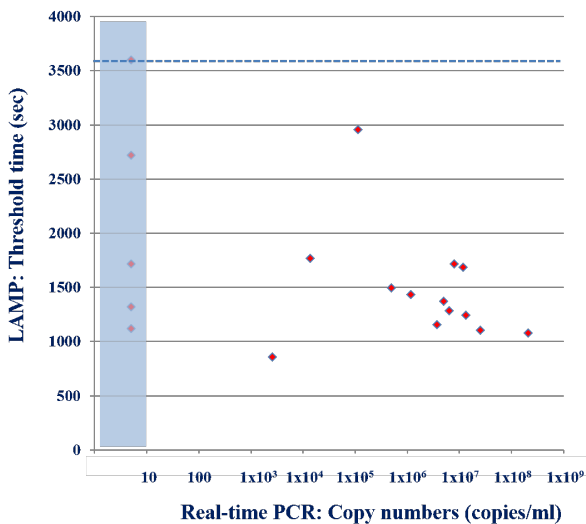
C. 研究結果

1. 倫理審査：本学での研究実施のための倫理審査申請を行い、審査委員からのコメントを基に revise を作成し再審査中である。

2. 尿からの CMV DNA 直接検出に関する基礎検討：先行する藤枝班、山田班の研究期間中に本学並びに関連病院で先天性 CMV 感染と診断された患児 11 名ならびに同胞 1 名から採取した尿 18 検体を用いて（患児保護者からの同意取得済み）、QIAamp DNA blood mini kit を使用して DNA 抽出した場合と、尿を直接検体として使用した場合で、real-time PCR 法と LAMP 法での CMV DNA 検出について解析した。

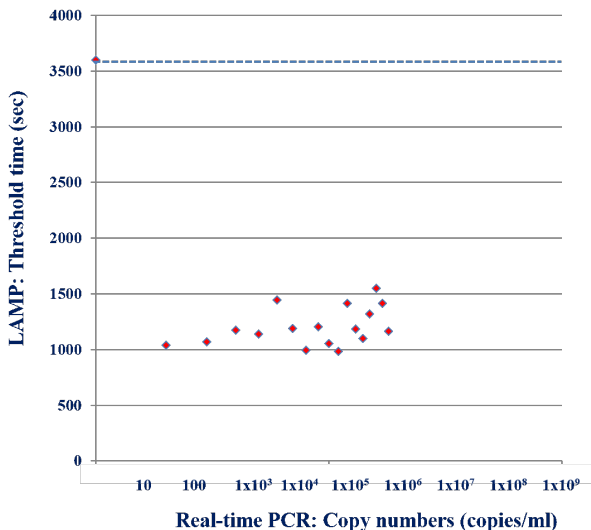
1) 直接法の場合の比較

網掛け部分の検体は LAMP 法では検出可能だが、real-time PCR 法では検出不可能。



2) DNA 抽出後の検体による比較

1 検体は両方法とも検出限界以下だが、その他の検体はいずれの方法でも検出可能。



D.考察

班全体の研究の中で、当施設の担当部分に焦点を絞り倫理委員会へ申請し、委員からの指摘を基に revise を作成して再審査申請中。近日中に承認が得られると予想され、その後健康コントロール血清などの採取に着手する予定である。

尿からの DNA 抽出を省略したより簡便な先天性 CMV 感染診断法の確立をめざし、保存尿検体を使用して基礎検討を行った・対象検体数は少ないが、予想通り LAMP 法では CMV DNA 陽性となっても、real-time PCR 法では陰性となる検体がみられた。よって、LAMP 法は尿から DNA 抽出することなく直接 CMV DNA 検出が可能で、先天性 CMV 感染の迅速かつ簡便な診断法となりえると思われる。多数例のスクリーニングには、real-time PCR 法のほうがすぐれていると考えられる。しかしながら、実際の臨床現場では先天性 CMV 感染疑いの症例は散発するため、LAMP 法によるより簡便、迅速な直接 DNA 検出法の有用性は極めて高いと思われる。これには、LAMP 法で使用する *Bst* ポリメラーゼが阻害物質に強いことが影響していると思われるが、今後血尿や蛋白尿などの影響に関する基礎的な検討を加え臨床応用へ向けたデータを蓄積してゆく必要がある。

E.結論

LAMP 法では、尿から DNA 抽出することなく直接ウイルス DNA 検出が可能で、先天性 CMV 感染の迅速かつ簡便な診断法となり得る。

G.研究発表

1.論文発表
該当なし

2.学会発表
該当なし

H.知的財産権の出願・登録状況
該当せず

研究協力者

藤田保健衛生大学小児科 河村吉紀

母子感染患者のフォローアップとレジストリに関する研究

研究分担者：岡明 東京大学医学部小児科

研究協力者：岩崎博之 東京大学医学部小児科

研究要旨 母子感染の中でも頻度が高く臨床的にも問題である先天性サイトメガロウイルス感染症（先天性CMV）と先天性トキソプラズマ感染症（先天性トキソ）について、本研究班として診断を行った児を中心としてレジストリを立ち上げ、今後はコホート集団として経過を観察することとした。診断時に同意を得てレジストリへの登録を行い、標準的なフォローアッププロトコルを提示するとともに、分担研究者による十分な情報提供を行うこととした。最新の新たな診断方法等により診断される患者母集団が変化してきており、その自然経過を明かにするとともに、頭部MRIなどの新しい検査結果により知的発達などのハイリスクの児を早期発見し、将来的には治療に結びつけるためにもコホート集団として調査を行っていくことが重要である。

A. 研究目的

母子感染症は以前よりTORCH症候群として、胎児期から終生にわたる障害をきたす重要な病態として知られてきた。

A-1 先天性サイトメガロウイルス感染症（先天性CMV）の現状と課題

TORCH症候群の中でも先天性CMVは、最も頻度の高い先天感染症として知られている。ヒトはCMVウイルスの唯一の宿主であり、感染すると長期にウイルスを尿などに排出するために水平感染を起こしやすい。抗体を保有していても再感染や再活性化も起こるため、麻疹などの終生免疫を獲得する疾患とは異なり、成人でも感染者が多い疾患であり、妊婦が感染をした場合に胎盤を通じて胎児に移行することが知られている。

我々の厚生労働科学研究での新生児スクリーニング調査研究では先天性CMVの頻度は1人/300人であり、これは現在新生児スクリーニング診断が行われているクレチン症の10倍の頻度であった。（Koyano S, et al 2011）。年間100万人の新生児の中で、先天性CMVの児は3000～4000名が罹患していることとなり、大変に重要な問題となっている。

この先天性CMVは、最近以下の様な点で

特に注目をされている。

（1）先天性難聴の重要な原因：先天性CMVでは、内耳の内リンパ系にウイルスが侵入し上皮細胞に感染し迷路炎をきたした後に、内リンパ系を破壊する。その結果、難聴を来すことが知られている。先天性難聴に対しては、早期診断・療育の重要性が認識されてきており、その中でも先天性CMVの占める頻度が高いことが認識されてきている。現在、難聴については新生児聴覚スクリーニングが施行されているが、先天性CMVでは新生児期以降に難聴が進行することも知られており、難聴の診断上の課題となっている。

（2）診断法の進歩：母子感染症の診断は、例えばCMV等のウイルスについてはウイルス分離等の方法が教科書的には記載されているが、臨床上実際的に有用な方法とはなっておらず、臨床現場で診断されることは非常にまれであり、正確な診断は困難な状況であった。近年、ウイルスの核酸検査が行われる様になり、比較的容易に診断が可能となってきている。特にCMVについては尿中に血液中よりも多コピー数が分泌されることから、尿を用いたスクリーニング検査なども可能になってきており、我々の先行研究でも濾紙を用いた先天性CMVをスクリーニングすることが可能であった。

(3) 臨床像の再把握が必要：先天性CMVのうち新生児期に症候性として気付かれるのは従来10から15%程度であり、多くの例は新生児期に気付かれないままで経過する。さらに、生後3週以降では、後天性の水平感染との鑑別が困難であり、何らかの症候があっても先天性CMVの診断をすることは困難であった。先天性CMVの臨床像は以下の様に中枢神経系も含めて多彩である。

IUGR	21 - 50%
早産	21 - 50%
中枢神経系	
髄膜脳炎	51 - 75%
小頭症	21 - 50%
脳内石灰化	51 - 75%
眼	
脈絡網膜炎	0 - 20%
網内系	
肝脾腫	76 - 100%
黄疸	51 - 75%
貧血	21 - 50%
点状・斑状出血	76 - 100%
その他	
肺炎	0 - 20%

(Volpe J. The neurology of the Newborn)

前述の様に診断法が進歩し変化している中で、核酸診断による新生児期の把握が可能となっており、その中で頭部MRIを含めた検査を行い、実際の病態を把握することが課題となっている。

(4) 母子感染のリスクの上昇：母体のCMV抗体保有率は低下傾向であり、妊婦がCMVに初感染する可能性が高くなってきている。このため、先天性CMV感染の頻度は上昇しているか

(5) 治療の可能性：多くの先天性難聴は人工内耳による治療が唯一の根本治療となるが、先天性CMVによる難聴では、抗ウイルス薬による治療が有効であることが示されている。従って、早期の診断と、治療の必要とする児に対する抗ウイルス治療が、その後の正常な言語発達などを誘導するためにも重要であると考えられ、海外でもそうした臨

床治験が行われている。

(Short-Term vs Long-Term Valganciclovir Therapy for Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infections: ClinicalTrial.gov Identifier NCT00466817)

A - 2 先天性トキソプラズマ感染症(先天性トキソ)の現状と課題

母子感染の中で先天性トキソは先天性CMVに次ぐ頻度であり、臨床的にも重要である。多くは無症候性であるが症候性では先天性CMVと同様に多彩な症状を呈することが知られている。

早産、IUGR	0 - 20%
中枢神経系	
痙攣	21 - 50%
髄膜脳炎	51 - 75%
脳内石灰化	51 - 75%
水頭症	21 - 50%
小頭症	21 - 50%
眼	
脈絡網膜炎	76 - 100%
網内系	
肝脾腫	21 - 50%
黄疸	21 - 50%
貧血	51 - 75%
点状・斑状出血	0 - 20%
その他	
肺炎	0 - 20%

(Volpe J. The neurology of the Newborn)

新生児期には診断されていない先天性トキソについては、その後に脈絡網膜炎や神経後遺症を呈する率は高率であることが指摘されている。乳児期の薬剤治療によってその予後が改善することも示されており、海外では先天性トキソに対する治療は標準的となっている。

A - 3 先天性CMVおよび先天性トキソに対する必要な対策

我が国の母子感染の現状として、前述の様な課題が残されており、下記のような対策が必要とされている。

(1) 標準的に使用可能な診断技術の開発が必要である。：先天性CMVは頻度が高いにも拘わらずその診断技術は、研究室レベルで診断をしている状況であり、我が国の臨床医療技術としては導入されていない。疑い例も診断やリスクを評価するシステムがないことから、医療現場での混乱を来している。

(2) 適正なフォローアップ体制が必要：現時点では国内で承認された治療法はないが、起こりえる合併症に対する適切な管理指導が必要である。診断法の進歩に即した臨床像の再評価を踏まえて、適切な指導を行える体制を作る必要がある。

(3) 治療法の導入の必要性がある。：トキソプラズマの治療薬は海外で一般的な使用薬剤であるが、国内で未承認のままとなっている。今後国内でも使用可能となるようにすべきであり、例えば免疫不全患者などに対する適応での開発要請も行われている。またCMVについては海外での臨床試験が行われている状況であるが、先天性CMVによる難聴児では、国内で医療施設単位で治療を行っているケースも報告されており、今後の対応が必要となっている。

B. 研究方法

母子感染については、新しい診断技術による診断に基づいた臨床像の再把握が必要であり、それにより今後の治療の適応などを検討する必要がある。本研究班では本年度は研究班の立ち上げに際して、当研究班で診断を行った児についてのレジストリを行うための準備を行った。

(倫理面への配慮)

本調査については東京大学医学部倫理委員会に申請し承認を受けた。

C. 研究結果

1) 研究班による診断体制と患者レジストリ体制(図1)

本研究班では、先天性CMVの可能性が高いと判断されたケースについては、分担研究者(木村)により新生児の核酸診断を行う。これは、先行する古谷野班、山田班で行って

きた核酸診断を現在広く受け入れる施設がないために、現在、先天性CMVの確定診断が困難になっている臨床現場の問題に対応するためにも重要である。

本レジストリについては、最初に診断を依頼する段階で担当医師には周知しているが、診断が確認された段階で、その後のフォローアップについて担当医師に対して十分な情報提供を行うとともに、改めてこのレジストリへの参加を確認する。

また、小児関連学会を通じて、他の施設にて先天性CMVを診断された児についてもレジストリへの参加を呼び掛ける。

先天性トキソについては、産婦人科分担研究者施設で胎児期から血清学的に母子感染の可能性があるとされた児について経過をみて、先天性トキソと診断をされた児を対象とする。担当医師に対して十分な情報提供を行うとともに、改めてこのレジストリへの参加を確認する。

(2) 感染児のフォローアップについて

レジストリに参加した児については、その後の定期的なフォローを、それぞれの地元医療機関を通じて行う。これは各地域ごとに、本研究班の小児科分担研究者が担当する。

このため、レジストリでは個人情報を除いた患者ファイルを小児科分担研究者間で共有し、担当した児についての情報収集は、フォローアップについての情報提供を行うと共に平行して進める。

研究班として先天性CMVフォローアップ推奨時期内容を調整した。(図2)

時期：初診+1か月、3~4か月、6か月、1歳、1歳6か月、2歳、3歳、4歳、5歳、6歳

内容：診察と発達評価、血液検査、ウイルス核酸検査(尿、血液)、聴力評価(聴性脳幹反応)、頭部画像検査、発達検査、頭部超音波検査、眼底検査

なお、児への不要な負担を可及的に減らすために血液検査や頭部MRI検査については、異常は認められた場合に、その後の経過を見る目的で繰り返すこととした。

また、発達検査については、できれば検査

者が施行する発達検査（新版K式等）が望ましいが、こうしたフォローアップは全国の医療機関で施行することになるために、保護者への質問紙形式であるKIDS乳幼児発達スケールを標準的方法としてスコア化することとした。情緒行動面については、子どもの行動チェックリスト（Child Behavior Checklist; CBCL）を施行することとした。

（3）先天性CMV レジストリ内容

古谷野班での研究成果を踏まえて、先天性CMVについては下記の情報を収集することとした。（図3）

表3 先天性CMV レジストリ項目

- ・ 個人情報：氏名、性別、住所、電話番号、
- ・ フォローアップ施設：担当施設、病院ID
- ・ 紹介施設：紹介施設、紹介医師、紹介医師 Email、施設住所、電話番号
- ・ 出生情報：生年月日、アプガースコア、出生週数、出生時体重・身長・頭囲
- ・ 妊娠経過等：母妊娠歴、同胞数、出産時年齢、子宮内発育不全（時期）、胎児エコー所見、妊娠中CMV感染（判定根拠）
- ・ 新生児期：CMV血清IgM、IgG、頭部画像異常、小頭症（SD）、肝障害（ALT数値）、血小板減少
- ・ aABR（日付、結果）
- ・ ABR（日付、年齢、結果、左右dB）
- ・ 眼底検査（検査日時、所見）
- ・ ウイルス量（日付、血液、尿）、肝機能（血液ALT、日付）
- ・ 頭部画像（検査日付、年齢、画像種類、画像結果*、画像結果コメント）
- * 石灰化、脳室拡大、脳萎縮、形成異常、白質変化、上衣下偽性嚢胞、その他
- ・ 治療
- ・ 発達検査（検査日付、暦年齢、検査種類、IQ-DQ、検査コメント）
- ・ 情緒行動評価：CBCL（検査日付、年齢、コメント）

（4）先天性トキソ レジストリ内容

先天性トキソについては、CMVと同様に中枢神経系の評価が重要であるが、加えて網膜所見が進行することがあり、その点を十分に

に評価できるように修正した。（図4）

表4 先天性トキソ レジストリ項目

- ・ 個人情報：氏名、性別、住所、電話番号、
- ・ フォローアップ施設：担当施設、病院ID
- ・ 紹介施設：紹介施設、紹介医師、紹介医師 Email、施設住所、電話番号
- ・ 出生情報：生年月日、アプガースコア、出生週数、出生時体重・身長・頭囲
- ・ 妊娠経過等：母妊娠歴、同胞数、出産時年齢、子宮内発育不全（時期）、胎児エコー所見、妊娠中トキソ感染（判定根拠）、治療
- ・ 新生児期：トキソ血清IgM、IgG、頭部画像異常、小頭症（SD）、肝障害（ALT数値）、血小板減少
- ・ 眼底検査（検査日時、所見）
- ・ 血液検査経過：トキソIgM、IgG、ALT
- ・ 治療
- ・ 頭部画像（検査日付、年齢、画像種類、画像結果*、画像結果コメント）
- * 石灰化、脳室拡大、脳萎縮、形成異常、白質変化、上衣下偽性嚢胞、その他
- ・ 発達検査（検査日付、暦年齢、検査種類、IQ-DQ、検査コメント）
- ・ 情緒行動評価：CBCL（検査日付、年齢、コメント）

D. 考察

母子感染により児には終生の後遺症を来すことがあり、その予防や治療は重大な健康上の問題である。しかし、現状では最新の診断法が臨床現場での標準的な方法として導入されていないなどの課題が大きく、本研究班としては臨床現場に診断などのサービスを提供しつつ、その技術が標準的な体外診断として確立するための研究を行う必要がある。

さらに、診断の最終的な目的は治療であるが、その臨床研究を行うためには、まず患者コホートを立ち上げ、最新の診断技術にて診断された児の自然経過を明かにすることが必要である。この様な患者レジストリはアメリカではベイラー医科大学小児科の National Congenital CMV Disease Registry

(<https://www.bcm.edu/pedi/infect/cmV/cmVhome>)があるが、こうした点について十分な情報を得るには至っていない。

そこで、本研究班として先行研究である厚生労働科学研究古谷野班および山田班での知見から、先天性CMVにおいて重要な項目を抽出し調査項目を作成した。

これにより期待できる新たな知見として以下の点が挙げられる。

- (1)母子感染による聴覚視覚障害の重症度、経過
- (2) 母子感染による頭部画像検査の特徴。特に頭部MRI検査所見と発達への影響の評価。
- (3) 母子感染による神経発達への影響と臨床像の特徴。

また、このコホートの中で、受診医療機関の判断で治療を行ったケースについては、今後の将来の治験の参考となると思われるので、合わせて情報を収集しておくことが可能である。

E. 結論

母子感染の中でも臨床的な意義が高い先天性CMVおよび先天性トキソについて、本研究班として患者レジストリを作成した。これにより、本研究班により診断された児を中心に、コホート集団としてフォローアップを行うことが可能である。

F. 研究発表 (2013/4/1~2014/3/31 発表)

1. 論文発表

[雑誌]

なし

[書籍]

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし。

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図1 先天性CMV・トキソ感染児レジストリ診断サービスと全国の患者情報の集約

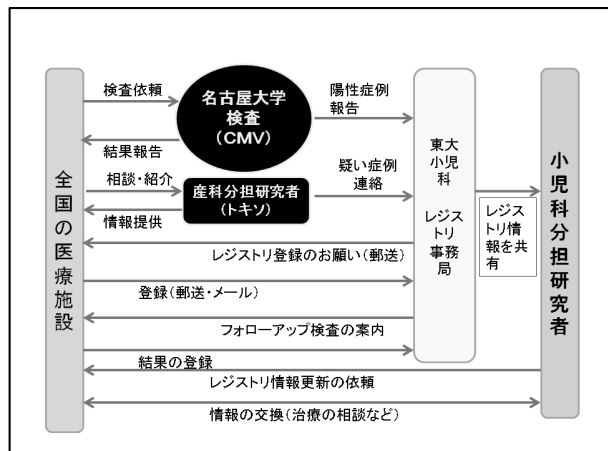


図2 母子感染フォローアップ推奨スケジュール

* : 前回異常を指摘された場合に施行

	初診+1 か月	3~4 か月	6か月	1歳	1歳6 か月	2歳	3歳	4歳	5歳	6歳
診察 発達評価										
血算、肝 機能			*	*	*					
ウイルス (尿、血液)										
ABR										
頭部MRI					*					
発達検査 など				KIDS	KIDS	KIDS	KIDS	KIDS	KIDS	WISC CBCL
その他	頭部超 音波 眼底検 査				新版K 式?					

図3 先天性CMV患者レジストリファイル内容

図4 先天性トキソ患者レジストリファイル内容

The form contains the following sections and fields:

- 基本情報 (Basic Information):** ID, 氏名 (Name), 性別 (Sex), 生年月日 (Date of Birth), 住所 (Address), 電話番号 (Phone Number), 保険番号 (Insurance Number).
- 症状 (Symptoms):** 発熱 (Fever), アプタチ (Apert's Syndrome), 咳 (Cough), 発疹 (Rash), けいこ (Convulsions), 黄疸 (Jaundice), トロントシ症候群 (Terson's Syndrome), 肝臓腫大 (Hepatomegaly), 脾臓腫大 (Splenomegaly), リンパ節腫大 (Lymphadenopathy), 網膜硝子体炎 (Chorioretinitis), 水頭症 (Hydrocephalus), 頭蓋内石灰化 (Intracranial Calcifications), 聴覚障害 (Hearing Loss).
- 検査結果 (Laboratory Findings):** トロントシ IgM, トロントシ IgG, トロントシ IgA, トロントシ IgG アビディティ (IgG Avidity), CSF IgG, CSF IgM.
- 画像検査 (Radiological Findings):** 超音波検査 (Ultrasound), CT検査 (CT Scan), MRI検査 (MRI Scan).
- 治療 (Treatment):** 治療開始日付 (Start Date), 治療終了日付 (End Date), 治療期間 (Duration), 治療内容 (Treatment Details).
- 経過観察 (Prognosis):** 経過観察日付 (Follow-up Date), 経過観察内容 (Follow-up Content).

尿中サイトメガロウイルス検出のための PCR 検査標準化を目指した研究

研究分担者	古谷野 伸	旭川医科大学小児科	講師
研究協力者	長森 恒久	旭川医科大学小児科	助教
	高橋 弘典	旭川医科大学小児科	医員

【研究要旨】

【目的】先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染の診断は、生後 3 週間以内の新生児から CMV を検出すればよい。その際の検査法としては、PCR が最も汎用されており、その検査材料としてはウイルス量や母乳の影響を考慮すると、尿が一番感度・特異度が高いと推定される。しかしながら、尿中 CMV 検出のために行われている定量的 PCR 検査は、あくまで研究用として実験室レベルで行われているのが現状である。そこで我々は PCR 検査の精度を明らかにし、体外診断用医薬品認可を取得するための研究を開始した。

【方法】旭川医科大学病院で親御さんからの同意の得られた 1 歳から 5 歳までの小児の残血清と尿を提供いただいた。血清は CMV に対する抗体を ELISA 法で測定し、尿は Real-time PCR を行って CMV DNA 量を測定した。

【結果】現在までに 15 名の小児から検体を提供いただいた。そのうち CMV-IgG が陽性で既感染と思われる小児は 7 名、未感染児は 8 名であった。尿中 CMV に関しては、実験室の都合でまだ未施行であるが、準備が整い次第実施する予定である。

【考察】1 歳から 5 歳までの小児 15 名から、血清・尿検体をいただいた。血清から既感染・未感染を判断し、その結果と PCR 法を用いた尿中 CMV DNA の検出法が合致するかを今後検討していくが、いまだ検体数が 15 と少ないので、尿中 CMV PCR の標準化のために、さらに検体数を増やしてその精度を証明する必要がある。

A . 研究目的

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染は最も頻度の高い先天感染であり、現在、日本では全出生児のうちの 0.3% が子宮内で CMV に感染している。そのうちの 20% 以上の感染児が出生時に点状出血、黄疸、肝脾腫、

小頭症などの症状を伴っている典型的な症候性感染児であり、それ以外にも診察上は異常が無いものの、頭部画像所見にのみ異常が見られる感染児が数%程度いる事がわかって来ている。合計すると、3 割を超える感染児に診察あるいは検査上の異常が認められる事になり、これは実数にすると、一年

間で 1000 人程度の新生児が、CMV の子宮内感染が原因で何らかの異常をもって出生している事になる。毎年、1000 人の新生児に健康被害がでる先天性 CMV 感染は、全国規模で対策を講じなければならない感染症であることは明らかである。

その対策を行うためには、新生児の確実な診断が必要である。先天性 CMV 感染の診断は、生後 3 週間以内の新生児から CMV を検出すれば良く、その検体としては、ウイルス量や母乳の影響から、尿が適当と我々は考えている。

現在、尿中 CMV の検出には PCR 法が汎用されているが、その検査はあくまでも実験室レベルで行われているに過ぎず、体外診断用医薬品の認可を受けた方法ではない。従って日常診療で行う事が可能となる保険診療の枠内での検査が出来ず、感染対策を行っていく上で、大きな足かせとなっている。

そこで体外診断医薬品の認可を受け、保険診療として検査が出来るように道を開くため、感染児と非感染児の鑑別が確実に出来ることを明確にするために、小児の血清学と尿中 CMV の有無を比較検討した。

B . 研究方法

対象は旭川医科大学病院で同意の得られた 1 歳から 5 歳の小児である。大学病院に受診し、何らかの理由で採血検査を受ける小児の残血清を利用し ELISA 法で CMV - IgG を測定した。あわせて尿の提供も受けて、尿は CMV DNA の有無を real-time PCR 法で検討した。

血清はあくまで何らかの理由で採血された残血清を提供いただき、この研究のみを目的とした採血は行わない方針とした。また尿の提供には痛みを伴わないため、この研究のみを目的としてご提供いただく事も可とした。

(倫理面への配慮)

すべての検体は患者家族に文書で同意を得て収集・解析を行った。本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得ている。

C . 研究結果 (表 1)

1 . 検体採取状況

16 名の親御さんから検体提供の同意を得たが、1 名からは尿採取が出来ず、研究対象者は 15 名であった。平均年齢は 3 歳 3 ヶ月で、最年少は 1 歳 0 ヶ月、最年長は 5 歳 11 ヶ月であった。

2 . 血清 CMV-IgG 測定結果

15 名のうち、抗体陽性者は 7 名で、平均年齢は 3 歳 4 ヶ月であった。また未感染児は残りの 8 名で、平均年齢は 3 歳 2 ヶ月であり、既感染児と未感染児の平均年齢にはほとんど差がなかった。

3 . 尿中の CMV DNA

尿中 CMV 検査は、実験室の都合でまだ未施行である。準備が整い次第行う予定である。

D . 考察

日本では 1 年間で、先天性 CMV 感

染児が 3000 人出生し、そのうち何らかの異常が認められる新生児は 1000 人に上る。ここ 1~2 年、先天性風疹症候群の児が風疹の流行により増加しているが、2013 年の発生数は 32 名であり、その数は症候性先天性 CMV 感染症の 1/30 に過ぎない。また風疹には有効なワクチンが存在し、すべての日本国民に対してワクチンが接種されれば、先天性風疹症候群は確実に「ゼロ」にすることが出来る。しかし先天性 CMV 感染は、感染を防ぐためのワクチンがまだ完成されておらず、さらに妊婦が妊娠中に初感染したとしても、風疹の様に自覚症状を感じることはほとんど無い。先天性 CMV 感染に対する対策が確立されていない現在、産科医が妊婦検診で CMV-IgG 抗体を測定しても、その後のフォローをどのように行っていけばいいかが定まっておらず、産科医も妊婦の検査を躊躇せざるを得ない。

このような現状を打開するためには、妊婦の抗体価スクリーニング、そして先天性 CMV 感染児の確実な診断とフォロー体制を確立し、日本全国で同じ水準の対策を講じる事が出来るようにしなければならない。

新生児の診断は、生後 3 週間以内に CMV が体内に証明できればよいが、それを調べる検体として、血液、尿、唾液などが候補となる。その中で血液はウイルス量が他の二つより少なく、偽陰性の危険がある。また唾液は、母乳中に含まれる可能性のある CMV の影響により疑陽性の危険がある。従って、我々は上記 3 つの検体候補のうち、尿がもっとも検査に向いていると考え

ている。その検出法であるが、その普及度から、real-time PCR が最も現実的な検査法と考えられる。実際、現在まで、尿中 CMV の検出は real-time PCR で問題なく行う事が出来ている。

しかしながら、CMV を検出するための real-time PCR 法は、体外診断用医薬品の認可を受けておらず、研究段階の技術にとどまっている。したがって現在いずれの検体を用いた場合でも、保険診療の範囲内では行う事が出来ず、自費診療か、病院の持ち出し、あるいは研究費でまかなわれているのが現状である。このような状態では、全国で統一された先天性 CMV 感染対策を行う事は不可能である。

そこで我々は、体外診断用医薬品の認可を受けることを目的として、小児の血清抗体価で、未感染・既感染を判定し、未感染のお子さんの尿から CMV が検出されず、既感染のお子さんの尿中からのみ CMV が検出される事をボランティアのお子さんの検体で証明しようとしている。現在まで、15 名の小児から検体を得ている。

現在、実験室の都合で尿中 CMV 検査が終了していないが、未感染児、既感染児がほぼ半々なので、その結果と尿中 CMV の結果を比較し、尿中 CMV 検査の妥当性を証明していきたい。

いずれにせよ、まだ 15 名しか検体が集まっておらず、検査データを積み上げて、体外診断用医薬品の申請につなげていきたい。

E . 結論

尿中サイトメガロウイルスを検出す

るための real-time PCR を体外診断用医薬品として認可してもらうためのデータ収集を開始した。さらに幼児の血清・尿ペア検体を集め、CMV 検出のための real-time PCR 法が信頼できるものであることを検証していく予定である。

G . 研究発表

1.論文発表

- 1) Koyano S, Inoue N, Nagamori T, Moriuchi H, Azuma H. Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding. *Arch Dis Child-Fetal*. 98: F182. 2013.
- 2) Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers. *J Clin Virol*. 58: 474-478. 2013.
- 3) Taniguchi R, Koyano S, Suzutani T, Goishi K, Ito Y, Morioka I, Oka A, Nakamura H, Yamada H, Igarashi T, Inoue N. Polymorphisms in *TLR-2* are associated with congenital cytomegalovirus(CMV)infectionbut not with congenital CMV disease. *Int J Infect Dis*. 17: e1092–e10972013.
- 4) 古谷野伸. TORCH 症候群 妊娠中の感染

に気をつけて 月刊地域保険 第 44 巻 第 6 号 P44-P49 2013 年

- 5) 古谷野伸. 先天性サイトメガロウイルス感染症 日本の現状と対策 小児科臨床 第 66 巻増刊号 P263-P268 2013 年

2.学会発表

- 1) 古谷野伸、森 泰宏、山田秀人：先天性サイトメガロウイルス感染予防のための未感染妊婦に対する啓発介入の試み。第 49 回日本周産期・新生児医学会、平成 25 年 7 月 14-16 日、横浜
- 2) 生田和史、峰松俊夫、石岡賢、佐藤友香、石橋啓、今村孝、藤原成悦、久保隆彦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫：サイトメガロウイルス血清型・DNA 型に基づく先天感染例の検討。第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月 10-12 日、神戸

H . 知的財産権の出願・登録状況 なし

表 1

検体番号	年齢	尿中 CMV	血清 CMV-IgG
1	1 歳 3 ヶ月	NA	11.3 (+)
2	3 歳 11 ヶ月	NA	0.3 (-)
3	4 歳 7 ヶ月	NA	0.3 (-)
4	5 歳 11 ヶ月	NA	11.9 (+)
5	4 歳 5 ヶ月	NA	0.2 (-)
6	3 歳 1 ヶ月	NA	9.4 (+)
7	3 歳 6 ヶ月	NA	7.9 (+)
8	5 歳 1 ヶ月	NA	0.5 (-)
9	4 歳 2 ヶ月	NA	7.0 (+)
10	2 歳 11 ヶ月	NA	10.9 (+)
11	2 歳 6 ヶ月	NA	10.7 (+)
12	1 歳 1 ヶ月	NA	0.4 (-)
13	3 歳 4 ヶ月	NA	0.2 (-)
14	2 歳 5 ヶ月	NA	0.2 (-)
15	1 歳 0 ヶ月	NA	0.4 (-)

NA; not available

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Koyano S</u> , Inoue N, Nagamori T, Moriuchi H, Azuma H.	Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding.	<i>Arch Dis Child-Fetal.</i>	98	F182	2013
Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, <u>Koyano S</u> , Suzutani T.	Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers.	<i>J Clin Virol.</i>	58	474-478.	2013
Taniguchi R, <u>Koyano S</u> , Suzutani T, Goishi K, Ito Y, Morioka I, Oka A, Nakamura H, Yamada H, Igarashi T, Inoue N.	Polymorphisms in <i>TLR-2</i> are associated with congenital cytomegalovirus(CMV) infection but not with congenital CMV disease.	<i>Int J Infect Dis.</i>	17	e1092–e1097.	2013

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究

分担研究者 小林廉毅 東京大学大学院医学系研究科公衆衛生学・教授

研究要旨：妊婦への感染を介して胎盤から胎児へ移行し、児の中樞神経系、聴覚系、視覚系などに障害を起こしうるウイルス・寄生虫疾患について、予防、診断、治療の包括的な母子保健医療体制の構築とそのための基盤整備が求められている。本研究班における TORCH 等感染疑い妊婦症例の前向き調査の実施にあたり、分担研究として、(1) 今後収集されるデータを用いて、精度の高いコスト分析や治療方針の検討を行うための決断樹 (decision tree) の作成、(2) 現状での TORCH に関わる妊婦スクリーニング検査の状況、および検査が行われる場合の費用負担についての調査を実施した。作成した母子感染スクリーニングに関わる決断樹については、今後の研究に基づいて数値を入れることにより、その有用性がより高まると考えられた。また、現状では、TORCH に関する妊婦スクリーニングについて、風疹抗体検査は積極的に行われているものの、他のスクリーニング検査については施設によって対応が分かれていた。

研究協力者

中村文明（東京大学大学院医学系研究科
公衆衛生学）

A. 研究目的

近年、先天性風疹症候群（CRS）の散発事例が報告されるようになっており、年によっては 10 例以上の発生が見られている。2004 年には 10 例の CRS の報告があり、2013 年には 32 例の報告があった。2013 年の 32 例の報告のうち、母親の妊娠中の風疹罹患歴「あり」が 22 例、「なし」が 3 例、「不明」が 7 例であり、妊婦が知らないうちに感染している事例が 1/3 を占めた。また、妊婦の風疹予防接種歴については、「あり」が 6 名、「なし」が 11 名、「不明」が 15 名であった（感染症発生動向調査）。

風疹以外にも、妊娠中に感染すること

によって児に障害をもたらす疾患は少ない。TORCH と総称される、Toxoplasma（トキソプラズマ）、Others、Rubella（風疹）、Cytomegalovirus（サイトメガロ）、Herpes simplex virus（単純ヘルペス）は、その代表的なものであるが、風疹以外は感染症法等による報告対象となっていないため、実態については不明な点が少なくない。

サイトメガロウイルスについては、厚生労働科学研究として行われた新生児スクリーニング調査によって、わが国で現在 300 人に 1 人という高い率で発生していることが報告されている（Koyano S, et al. 2011）。また、頻度は少ないものの、先天性トキソプラズマ症は妊婦の早期診断・早期治療により予防しうるとされている（今日の治療指針 2013 年版、新臨床内科学第 9 版）。他方、先天性トキソプラ

ズマ症の治療は確立されておらず、また、推奨される薬剤のピリメタミン、スルファジアジンには保険適用がないとの指摘もある（今日の小児治療指針第15版）。

このように、TORCH に代表される妊婦への感染を介して胎盤から胎児へ移行し、児の中樞神経系、聴覚系、視覚系などに障害を起こしうるウイルス・寄生虫疾患について、予防、診断、治療の包括的な母子保健医療体制の構築とそのため基盤整備が求められている。

本年度は初年度であり、研究班全体として、TORCH 等感染疑い妊婦症例の前向き調査の体制整備や収集すべき情報の整理が行われている。そこで、分担研究として、(1) 今後収集されるデータを用いて、精度の高いコスト分析や治療方針の検討を行うための決断樹（decision tree）の作成、(2) 現状での TORCH 等に関わるスクリーニング検査の状況、および検査が行われる場合の費用負担についての調査を実施した。

B. 研究方法

(1) 母子感染スクリーニングに関わる決断樹の作成

今後収集されるデータを用いて、先天性サイトメガロウイルス症や先天性トキソプラズマ症の妊婦スクリーニングに係わるコスト分析や治療方針の検討が可能となる決断樹について、専用ソフトを用いて作成した。

(2) TORCH に関する妊婦スクリーニングの現状調査

「母子感染の実態調査把握及び検査・治療に関する研究班」への調査協力を行っている8施設へ質問紙による調査を行った。各施設の所属長宛に電子メール添

付の質問紙を送り記入を依頼した。

調査項目は、サイトメガロウイルス IgG 抗体、サイトメガロウイルス IgM 抗体、トキソプラズマ IgG 抗体、トキソプラズマ IgM 抗体、風疹抗体、単純ヘルペスウイルス IgG 抗体に関して、妊婦健診でのスクリーニングを行っているか、各項目を実施している場合にはそれぞれの費用負担の方法（患者負担、施設負担、研究費負担、その他）について質問を行った。

（倫理面への配慮）

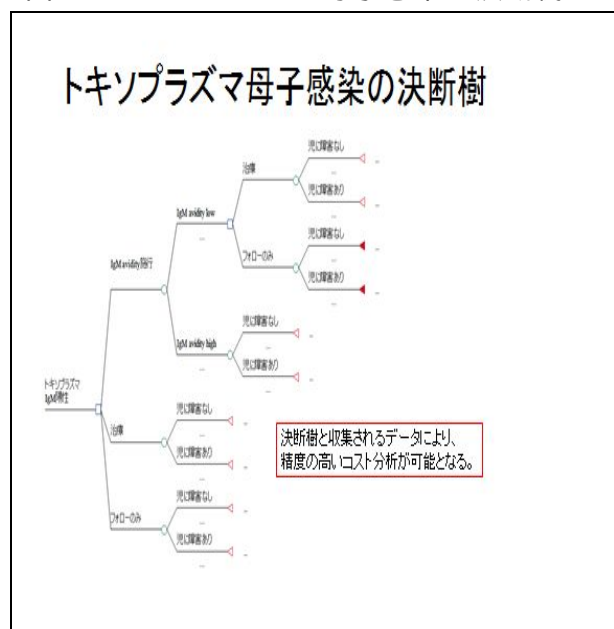
本調査では個人情報扱っていないので、倫理的問題は生じない。

C. 研究結果

(1) 母子感染スクリーニングに関わる決断樹の作成

サイトメガロウイルス症と先天性サイトメガロウイルス症に係わる母子感染の予防・治療の決断樹を作成した。図1にトキソプラズマの決断樹を示す。

図1 トキソプラズマ母子感染の決断樹



(2) TORCH に関する妊婦スクリーニングの現状調査

報告書作成時点で 6 施設より回答を得た。回答施設はすべて大学病院であった。図 2 (文末) に、妊婦健診において母子感染原因を起こす各種病原体のスクリーニング検査の実施状況を示す。サイトメガロウイルス IgG 抗体をスクリーニングしていると回答した施設は 3 施設 (50%) であり、これらの施設ではサイトメガロウイルス IgM 抗体のスクリーニングも行っていった。サイトメガロウイルス抗体のスクリーニングを行っていた施設において、費用負担はすべての施設で患者負担としていた。

トキソプラズマに関しては、1 施設 (17%) のみスクリーニングを行っていると回答した。この施設においては、以前はトキソプラズマ IgG 抗体を測定していたが、現在はトキソプラズマ抗体 PHA 法を測定しているとの回答であった。トキソプラズマ PHA 法では、IgG、IgM のどちらの抗体も検出されるため IgM の測定は行われていなかった。費用は患者負担にしているとのことであった。

風疹抗体に関しては、すべての施設においてスクリーニング検査がされていた。風疹抗体の費用負担は、「自費」が 3 施設、「その他」が 3 施設であったが、後者についてはすべて公費負担と付記されていた。妊婦の居住する市区町村により公費助成が受けられる場合があると解釈できる。単純ヘルペスに関しては、すべての施設においてスクリーニング検査はされていなかった。

D. 考察

決断樹 (decision tree) は、不確定要素が存在する状況において臨床上の決断を

行う場合、複雑な状況を整理したり、あるいは数量的な目安を得たりするための参考となるものである。今後、本研究が進展し、決断樹上の各々の確率的分岐点 (chance node) に数値を入れることにより、決断樹の有用性がより高まると考えられる。

TORCH に関する妊婦スクリーニングの現状調査の結果からは、ハイリスク妊婦を受け入れる高次医療機関が、現行の制度的制約のもとで、どのような対応をとっているかについて重要な手がかりを得ることができる。とりわけ、妊婦の風疹抗体検査に関しては、自治体の公費助成などがあることから、積極的にスクリーニング検査がされていると考えられた。

実際、全国自治体に対する厚生労働省の通知において、風疹抗体検査は、妊婦健康診査で実施する標準的な診査項目として含まれている (平成 23 年 3 月 9 日雇児母発 0309 第 1 号 (一部改正)「妊婦健康診査の実施について」)。しかし、全国自治体の妊婦 1 人あたりの公費負担額は、4 万円台から 12 万円以上と幅があるため (全国平均 9.7 万円。「妊婦健康診査の公費負担の状況にかかる調査結果について」厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課、2013) 実施状況は地域によって異なる可能性もある。さらに、個々の抗体検査の費用額自体が実施の有無に影響を与えている可能性もあろう。

E. 結論

母子感染スクリーニングに関わる決断樹を作成した。今後の研究に基づいて数値を入れることにより、決断樹の有用性はより高まると考えられる。また、現状では、TORCH に関する妊婦スクリーニングについて、風疹抗体検査は積極的に

行われているものの、他のスクリーニング検査については施設によって対応が分かれていた。

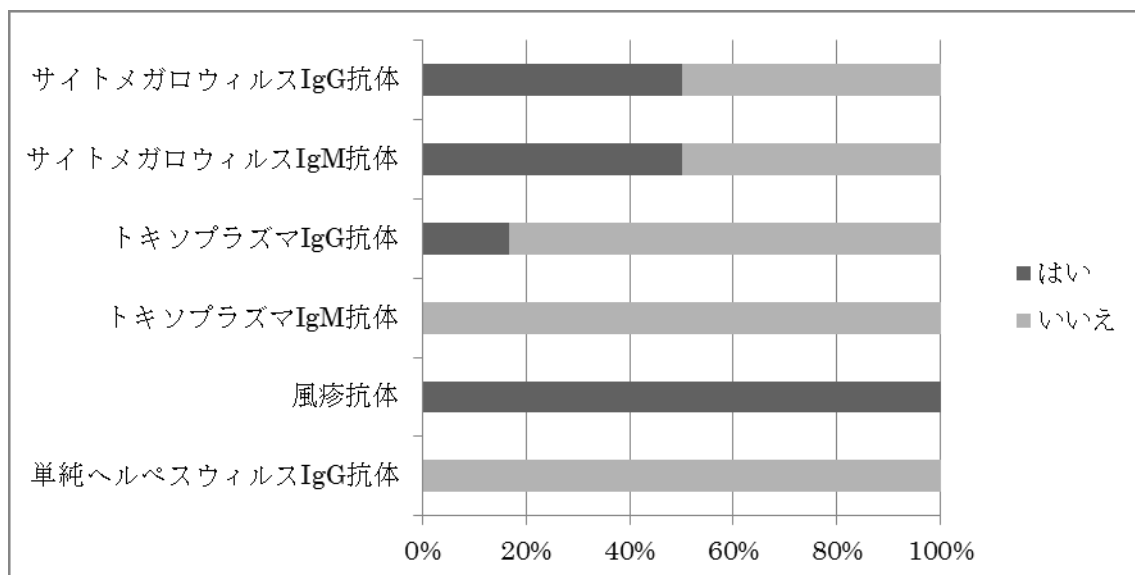
- 1. 論文発表
なし
- 2. 学会発表
なし

F. 健康危険情報
なし

H. 知的財産権の出願・登録
なし

G. 研究発表

図2 妊婦スクリーニングの現状



先天性サイトメガロウイルス感染の新生児における出生時の症候性と関連する臨床検査データの検討

研究分担者 森岡 一朗 神戸大学医学部附属病院 周産母子センター 小児科 講師
研究分担者 山田 秀人 神戸大学大学院医学研究科 外科系講座 産科婦人科学 教授
研究協力者 出口 雅士 神戸大学医学部附属病院 周産母子センター 産科 講師

【研究要旨】

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染児において、症候性と関連する臨床検査データの特徴を見いだすことを目的とした。対象は、生後1週間以内の尿でCMV-DNA陽性を確認し、先天性CMV感染と確定診断した新生児23人（症候性10人、無症候性13人）。血中総IgM、CMV-IgM、CMV抗原陽性白血球（C7-HRP法）、血液・尿CMV-DNAを同時に定量し、その陽性の割合や定量値を症候性児と無症候性児で比較した。各検査が陽性であった児の割合は、総IgM 74%、CMV-IgM 52%、CMV抗原陽性白血球 44%、血液CMV-DNA 96%、尿CMV-DNA 100%であった。症候性/無症候性児の比較では、総IgMの陽性児の割合と総IgM値は、症候性児は無症候性児に比して有意に低かった。一方、症候性児の血液CMV-DNA値は、無症候性児に比較して有意に高値であった。先天性CMV感染の新生児において、総IgM値が低く血中CMV量が多いことが、症候性と関連があった。

A．研究目的

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染児は、出生時に胎児発育不全・低出生体重・中枢神経や肝機能障害を含む多臓器障害を呈する症候性と、出生時に症状を有さない無症候性に大別される。症候性児は、その約90%の症例に重大な神経学的後遺症を残すとされている一方、無症候性児は約10%の症例でのみ難聴・精神発達遅滞等の後障害がみられる。このように、先天性CMV感染児は出生時の症状の有無によりその長期予後は大きく異なる。

従来より母子感染の診断には、総IgMや微生物特異的IgMが用いられている。さらに近年、CMV感染を診断するためのCMV抗原陽性白血球やCMV-DNAの有用性も証明され、日常診療に使用されるようになってきた。しかし、先天性CMV感染の新生児にこれらのすべてを同時に測定し、

評価された研究はない。

我々は、先天性CMV感染の新生児において、これらの検査の陽性児の割合や定量評価を行い、神経学的長期予後が不良な症候性児の検査データの特徴を見いだすことを目的とした。

B．研究方法

1) 対象

神戸大学医学研究科倫理委員会の承認と児の両親の同意のもと、2009年11月より2013年3月の間に、神戸大学病院および関連病院（兵庫県立こども病院、なでしこレディースホスピタル）で出生した4,364人の新生児に生後1週間以内の尿を用いてCMVスクリーニング検査を施行した。尿スクリーニングでCMV-DNA陽性で、新生児期に神戸大学病院で診察・精密検査を施行した23人（0.53%）を本研究の

対象とした。

対象児は、血液検査、眼底検査、頭部画像検査（超音波、CT、MRI）、聴性脳幹反応（ABR）検査を実施し、症候性と無症候性に分類した。血中総 IgM、CMV-IgM、CMV 抗原陽性白血球（C7-HRP 法）、血液・尿 CMV-DNA を同時に測定した。

2) 方法

全先天性感染児の血中総 IgM、CMV-IgM、CMV 抗原陽性白血球、血液・尿 CMV-DNA の陽性児の割合を算出した。

陽性児の割合や各検査項目の定量値を症候性児と無症候性児で比較した。

症候と関連する検査項目につき、ROC 曲線を作成してカットオフ値を調べた。

児の在胎週数と総 IgM、血液 CMV-DNA 値の相関につき、解析した。

3) 症候性感染の定義

症候性感染は、初診時に少なくとも以下の 1 つの症状があるものと定義した。Small-for-gestational age（SGA、出生体重が $-1.5SD$ 未満）、肝脾腫/肝機能障害（AST が $100 U/L$ 以上）、血小板減少（ 10 万/ μL 未満）、脳画像異常（皮質形成異常、脳室拡大、石灰化、上衣下嚢胞）、網膜脈絡膜炎、ABR 異常（修正 37 週以上では $40dB$ 、修正 34-36 週では $50dB$ で V 波の検出不可）とした。

3) 測定方法

新生児の尿 CMV スクリーニング検査は、尿濾紙検体を用い、神戸大学検査部において濾紙サンプルから DNA を精製したうえで PCR を行い、CMV-DNA 発現を調べた。

総 IgM、CMV-IgM の測定は、Siemens Healthcare Diagnostics 社（東京）のキットを用い、各々ネフェロメトリー法、EIA 法により行った。CMV 抗原陽性白血球の測定は、SRL 社（東京）に依頼し、p65 抗原

に対するヒトモノクローナル抗体（C7）を用いた直接免疫ペルオキシダーゼ法（C7-HRP 法）で行われた。CMV-DNA の検出はリアルタイム定量 PCR 法により行った。各検査の陰性基準値は、総 IgM 20 mg/dL、CMV IgM 0.9 Index 値、CMV 抗原陽性白血球 $1/5$ 万白血球数、血液 CMV-DNA 1.0×10^2 コピー/ 100 万白血球数、尿 CMV-DNA 3.0×10^3 コピー/mL 未満とした。

4) 統計解析

数値は中央値（範囲）または人（%）で表し、症候性児と無症候性児の 2 群間の比較にはマン・ホイットニーの U テスト、フィッシャー正確検定を用いた。症候と関連する検査項目につき、ROC 曲線を作成してカットオフ値を調べ、感度、特異度を算出した。児の在胎週数と総 IgM、CMV-DNA 値の相関は、線形回帰分析を用い、相関係数を算出した。p 値 0.05 未満を有意とした。

（倫理面の配慮）

本研究は、神戸大学大学院医学研究科倫理委員会の承認、新生児の保護者の書面での同意のもと行われた。対象はコード番号化することで連結可能匿名化を図り、適切に行われた。

C . 研究結果

全先天性感染児は、症候性 10 人と無症候性 13 人に分類できた。その臨床背景を表 1 に示す。症候性児の在胎週数、出生体重は、無症候性児に比して有意に小さかった（中央値： 36 週 vs. 38 週、 2188 g vs. 2758 g）。精査が行われた日齢は、症候性児は無症候性児に比して有意に早かった（日齢 1 vs. 19 ）。症候性児の症状は、SGA 2 人、肝脾腫/肝機能障害 4 人、血小板減少 5 人、脳画像異常 7 人、ABR 異常 7 人、網膜脈絡膜炎 4 人であった。

各検査値が陽性であった児の割合は、総 IgM が 78%、CMV IgM が 52%、CMV 抗原陽性白血球が 44%、血液 CMV-DNA が 96%、尿 CMV-DNA が 100%であった。総 IgM の陽性児の割合は、症候性児が無症候性児に比して有意に低かったが、その他の検査では有意な差はなかった（表 2）。

定量値を解析したところ、症候性児は無症候性児に比して、総 IgM 値は有意に低く、血液 CMV-DNA 値は有意に高値であった。CMV-IgM、CMV 抗原陽性白血球数は両群に有意差はなかった（図 1）。

総 IgM 値、血液 CMV-DNA 量と症候の有無との関連につき、ROC 曲線で解析すると、area under the curve (AUC)は各々 0.854、0.842 であった。総 IgM のカットオフ値を 25 mg/dL とした場合に感度×特異度が最大となり、感度 80%、特異度 85%であった。また、同様に、血液 CMV-DNA のカットオフ値を 1.8×10^2 コピー/100 万白血球数とした場合、感度 80%、特異度 92%となった。

在胎週数と総 IgM、血液 CMV-DNA 値の相関を調べると、症候性児、無症候性児ともに、有意な相関はなかった（総 IgM：症候性児は $R^2=0.098$, $p=0.38$ 、無症候性児は $R^2=0.00091$, $p=0.92$ 、血液 CMV-DNA：症候性児は $R^2=0.17$, $p=0.24$ 、無症候性児は $R^2=0.017$, $p=0.67$ ）。

D . 考察

今回の検討で、先天性 CMV 感染の新生児は、総 IgM 値が低く血中 CMV 量が多いことが、症候性と関連があった。症候性児の CMV 量が多いことは、以前より報告されているが、今回、症候性児で総 IgM が低値となることを初めて見いだした。その理由として、妊娠早期の CMV 感染の方が、後期の感染より胎児により重篤な症状を引き起こすため、妊娠早期の母体 CMV 感染の結果、感染から出生まで長期間

であり、その間に総 IgM は減少したのかもしれない。または、妊娠早期に感染を受けた症候性児は、免疫応答が未熟である可能性がある。症候性児の総 IgM が低値となる機序は明らかではなく、今後のさらなる研究が必要である。

今回の先天性 CMV 感染児の全対象において、CMV-IgM 陽性児の割合は 52%で、我が国や欧米の過去の報告（15%～71%）と一致していた。また、CMV 抗原陽性白血球においても、我々の結果では感染児の 44%のみが陽性であり、過去の報告とほぼ一致していた。このことは、先天性 CMV 感染児を CMV-IgM や CMV 抗原陽性白血球を用いて診断すると、約半数の先天性感染児が見逃されることになるため、注意する必要がある。

本研究の限界は、臨床背景において、症候性児は症状を有し早産出生や NICU に入院する児が多かったため、無症候性児よりも在胎週数や精査が行われた日齢が有意に小さかったことが挙げられる。しかし、在胎週数と総 IgM、血液 CMV-DNA 値に有意な相関はなかったため、検査時齢の影響は少なくとも大きな影響はないものと考えている。

E . 結論

5. 先天性 CMV 感染の新生児において、総 IgM 値が低く血中 CMV 量が多いことが、出生時の症候性と関連があった。
6. 症候性、無症候性にかかわらず、血中 CMV-IgM や CMV 抗原陽性白血球を用いて診断した場合、約半数の先天性感染児を見逃すことになる。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ebina Y, Minematsu T, Sonoyama A, Morioka I, Inoue N, Tairaku S,

Nagamata S, Tanimura K, Morizane M, Deguchi M, Yamada H. The IgG avidity value for the prediction of congenital cytomegalovirus infection in a prospective cohort study. *J Perinat Med*. In press, 2014

- 2) Morioka I, Sonoyama A, Tairaku S, Ebina Y, Nagamata T, Morizane M, Tanimura K, Iijima K, Yamada H. Awareness of and knowledge about mother-to-child infections in Japanese pregnant women. *Congenit Anom*, 54, 35-40, 2014
- 3) Matsuo K, Morioka I, Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, Inoue N, Yamada H, Iijima K. Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev*. 36, 10-15, 2014
- 4) Yamada H, Tairaku S, Morioka I, Ebina Y, Sonoyama A, Tanimura K, Deguchi M, Nagamata S. A nationwide survey of maternal screening for mother-to-child infections in Japan. *Congenit Anom*. doi:10.1111/cga.12044, 2013
- 5) 森岡一朗, 山田秀人, 平久進也, 蝦名康彦, 出口雅士, 香田 翼, 飯島一誠: 母子感染が疑われる児への対応、サイトメガロウイルス抗体・トキソプラズマ抗体. 小児科診療: 77 (3), 347-350, 2014
- 6) 山田秀人, 平久進也, 森岡一朗, 蝦名康彦: 母子感染の最近の動向 妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の一次アンケート全国調査の結果. 臨床婦人科産科: 67(1), 59-62, 2013
- 7) 山田秀人, 平久進也, 森岡一朗, 蝦名康彦, 出口雅士, 長又哲史: 母子感染の恐れのある感染症の情報. 助産雑誌: 67(7), 520-525, 2013
- 8) 山田秀人, 森岡一朗, 平久進也, 谷村憲司, 出口雅士, 蝦名康彦: 我が国における多施設共同研究の現状 - サイトメガロウイルス. 周産期医学: 43(10), 1295-1299, 2013

2.学会発表

- 1) Ebina Y, Sanoyama A, Tairaku S, Morioka I, Tanimura K, Morizane M, Deguchi M, Minematsu T, Inoue N, Yamada H. Diagnostic value of IgG avidity for prediction of congenital cytomegalovirus infection. 17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, June 3 to 6, 2013, Lisbon, Portugal
- 2) Tairaku S, Ebina Y, Sonoyama A, Morioka I, Tanimura K, Morizane M, Minematsu T, Inoue N, Yamada H. Low IgG avidity and ultrasound fetal abnormality predict congenital cytomegalovirus infection. 17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, June 3 to 6, 2013, Lisbon, Portugal
- 3) Yamashita M, Morioka I, Sonoyama A, Tairaku S, Tanimura K, Ebina Y, Iijima K, Yamada H. Awareness of

and knowledge about mother-to-child infections in Japanese pregnant women. 17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, June 3 to 6, 2013, Lisbon, Portugal

- 4) 森岡一朗、黒川大輔、藤田花織、長坂美和子、香田 翼、松尾希世美、横田知之、柴田暁男、山田秀人、飯島一誠：先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症の診断における CMV 感染関連血液検査値に関する検討、第 58 回日本未熟児新生児学会、平成 25 年 11 月 30 日-12 月 1 日、金沢
- 5) 森岡一朗：「母子感染～それぞれの立場から見えてくる問題点～」新生児科医がすべきこと(シンポジウム)、第 45 回日本小児感染症学会、平成 25 年 10 月 26-27 日、札幌
- 6) 橋村裕也、西田明弘、山中 巧、原田敦子、林 振作、山崎麻美、森岡一朗、南 宏尚：生後 4 か月時に急速な頭囲拡大で発見された先天性サイトメガロウイルス感染症の 1 症例、第 45 回日本小児感染症学会、平成 25 年 10 月 26-27 日、札幌
- 7) 谷口留美、古谷野伸、錫谷達夫、五石圭司、伊藤裕司、森岡一朗、中村浩幸、山田秀人、岡 明、井上直樹：NK 細胞の標的細胞認識に関わる遺伝子多型と先天性 CMV 感染症の相関、第 45 回日本小児感染症学会、平成 25 年 10 月 26-27 日、札幌
- 8) 森岡一朗：周産期感染症：インフルエンザウイルスとサイトメガロウイルスに関する最近の知見(特別講演)、第 39 回和歌山周産期医学研究会、平成 25 年 9 月 7 日、和歌山
- 9) 平久進也、蝦名康彦、長又哲史、園山綾子、谷村憲司、森岡一朗、峰松俊夫、山田秀人：効果的な妊婦 CMV スクリーニング法の確立を目指して、第 49 回日本周産期新生児医学会、平成 25 年 7 月 14-16 日、横浜
- 10) 蝦名康彦、平久進也、長又哲史、森上聡子、谷村憲司、出口雅士、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：母体血サイトメガロウイルス IgG avidity 測定による先天性感染の発生予知、第 28 回ヘルペスウイルス研究会、平成 25 年 5 月 30 日-6 月 1 日、淡路
- 11) 平久進也、谷村憲司、園山綾子、上中美月、長又哲史、山下萌、篠崎奈々絵、松岡正造、蝦名康彦、森岡一朗、山田秀人：全国妊婦健診施設を対象とした妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の実態調査、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌
- 12) 長又哲史、蝦名康彦、平久進也、谷村憲司、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：効果的な妊婦 CMV スクリーニング法の確立を目指して、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌
- 13) 谷村憲司、森岡一朗、園山綾子、平久進也、蝦名康彦、森實真由美、山田秀人：免疫グロブリンを用いた先天性サイトメガロウイルス感染に対する胎児感染予防と治療、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌
- 14) 森上聡子、蝦名康彦、平久進也、谷

村憲司、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：母体血サイトメガロウイルス IgG avidity測定による先天性感染の発生予知、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌

15) 足立陽子、園山綾子、平久進也、谷村憲司、蝦名康彦、森岡一朗、山田秀人：母子感染に関する妊婦の知識調査、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌

16) 森岡一朗、谷村憲司、平久進也、園山綾子、蝦名康彦、山田秀人：先天性サ

イトメガロウイルス感染症に対するバルガンシクロビル療法の効果と副作用、第 65 回日本産科婦人科学会、平成 25 年 5 月 10-12 日、札幌

17) 山名啓司、藤村順也、多田慎吾、萩原優子、中川温子、沖田 空、湊川 誠、森沢 猛、米谷昌彦、森岡一朗：一過性骨髄異常増殖症への化学療法後に後天性 CMV 感染を発症した 21 トリソミーの一例、第 116 回日本小児科学会、平成 25 年 4 月 19-21 日、広島

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morioka I, Sonoyama A, Tairaku S, Ebina Y, Nagamata T, Morizane M, Tanimura K, Iijima K, Yamada H.	Awareness of and knowledge about mother-to-child infections in Japanese pregnant women.	Congenit Anom,	54	35-40.	2014
Matsuo K, Morioka I, Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, Inoue N, Yamada H, Iijima K.	Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection.	Brain Dev.	36	10-15	2014

表 1. 先天性感染児の背景

A. 臨床背景

	全感染児 n = 23	症候性 n = 10	無症候性 n = 13
在胎週数 (週)	38 (31-41)	36 * (31-38)	38 (35-41)
出生体重 (g)	2,606 (1,378-3,840)	2,188 * (1,378-3,160)	2,758 (2,060-3,840)
男児 / 女児	6/17	4/6	2/11
精査を施行した日齢 (日)	8 (0-28)	1 ** (0-27)	19 (0-28)

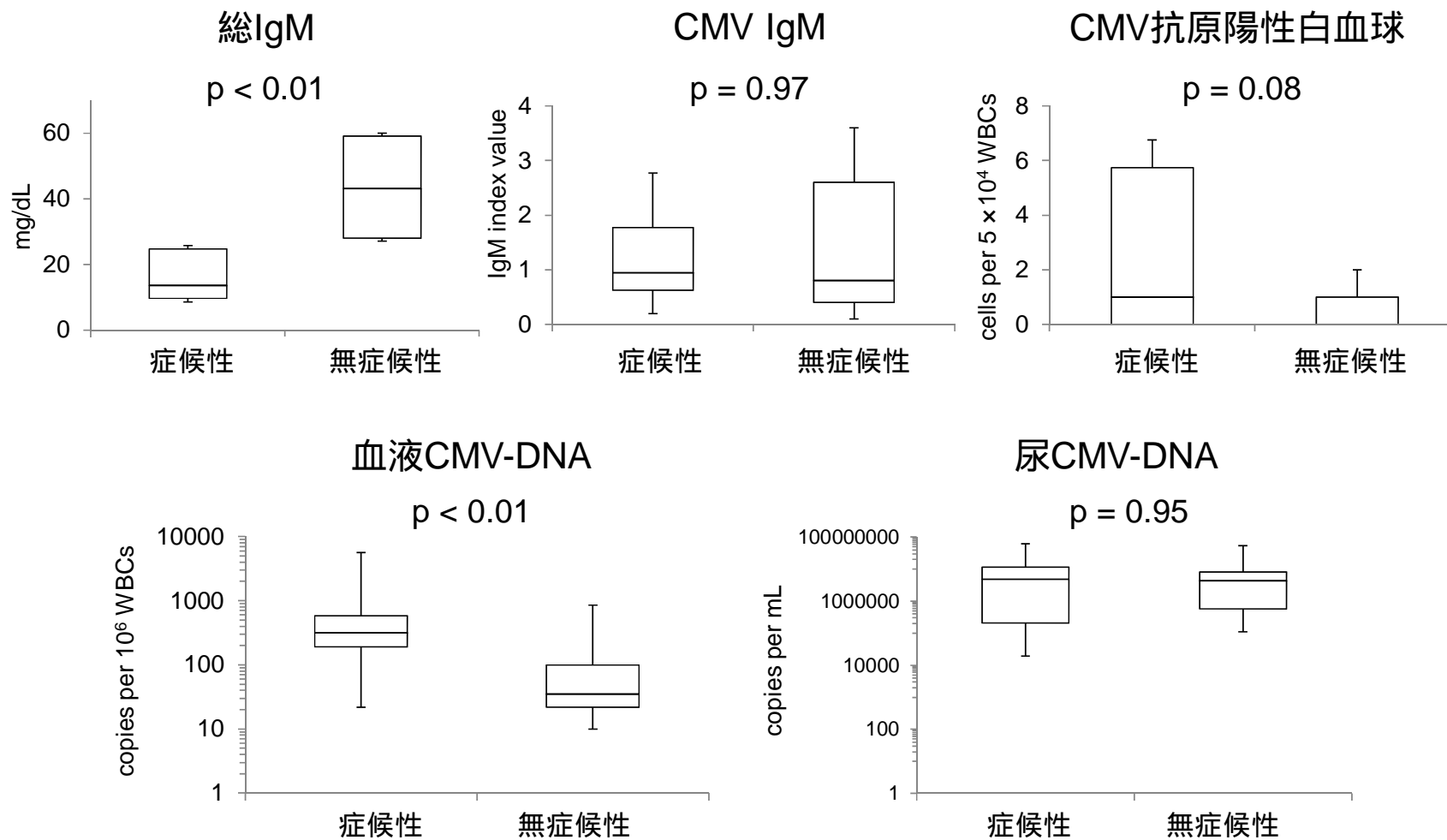
* p < 0.05, ** p < 0.01 無症候性と比較して

B. 症候性児

症例 #	在胎週 (週)	出生体重 (g)	臨床症状					
			SGA	肝脾腫/肝機能障害	血小板減少	脳画像異常	ABR 異常	網膜脈絡膜炎
1	31	1378						
2	31	1824						
3	32	1396						
4	36	1860						
5	36	2184						
6	36	2192						
7	36	2450						
8	38	2868						
9	38	2956						
10	38	3160						

ABR: 聴性脳幹反応, SGA: Small-for gestational age, : 症状ありを示す

図1 症候性児と無症候性児における各検査項目の定量値の比較



研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
森内浩幸	先天性サイトメガロウイルス感染症.	黒崎知道, 田原卓浩	総合小児医療：プライマリ・ケアの感染症 身近な疑問に答える Q&A	中山書店	東京都	2013	168-169

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Pereira L, Petitt M, Fong A, Tsuge M, Tabata T, Fang-Hoover J, Maidji E, Zydek M, Zhou Y, <u>Inoue N</u> , Logahvi S, Pepkowitz S, Ogunyemi D.	Intrauterine growth restriction caused by underlying congenital cytomegalovirus infection.	J Infect Dis			印刷中
Matsuo K, Morioka I, Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, <u>Inoue N</u> , Sugimura K, Yamada H, Iijima K.	Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection.	Brain & Dev	36	10-15	2014
<u>Koyano S</u> , <u>Inoue N</u> , Nagamori T, Moriuchi H, Azuma H.	Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding.	Arch Dis Child Fetal	98	F182	2013
Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, <u>Inoue N</u> , Fujiwara S.	Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress.	Herpesviridae	4	2	2013
Taniguchi R, <u>Koyano S</u> , Suzutani T, Goishi K, Ito Y, Morioka I, Oka A, Nakamura H, Yamada H, Igarashi T, <u>Inoue N</u> .	Polymorphisms in Toll-like receptor 2 are associated with congenital cytomegalovirus infection.	Int J Infect Dis	17	e1092-7	2013
Ikuta K, Minematsu T, <u>Inoue N</u> , Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, <u>Koyano S</u> , <u>Suzutani T</u> .	Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers.	J Clin Virol	58	474-478.	2013
Morioka I, Sonoyama A, Tairaku S, Ebina Y, Nagamata T, Morizane M, Tanimura K, Iijima K, <u>Yamada H</u> .	Awareness of and knowledge about mother-to-child infections in Japanese pregnant women.	Congenit Anom,	54	35-40.	2014

Matsuo K, <u>Morioka I</u> , Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, <u>Inoue N</u> , Yamada H, Iijima K.	Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection.	Brain Dev.	36	10-15	2014
Torii Y, Kimura H, Ito Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H.	Clinico-epidemiological states of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan.	Pediatr Infect Dis J	32	699-701	2013
Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H	Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan.	Pediatr Int	55	566-571	2013
Yamada H, Tairaku S, Morioka I, Ebina Y, Sonoyama A, Tanimura K, Deguchi M, Nagamata S.	A nationwide survey of maternal screening for mother-to-child infections in Japan.	Congenit Anom. doi:10.1111/ cga.12044, 2013		doi:10.1111/ cga.12044, 2013	2013
森内浩幸	教育講演 鵜の目鷹の目、フクロウの目—サイトメガロウイルスを見逃すな！	日本未熟児新生児学会雑誌	25	7-12	2013
森内浩幸	特集 いま知りたい！母子感染対策トキソプラズマ, サイトメガロウイルスを中心に 予防対策の基本 特にトキソプラズマ, サイトメガロウイルスの注意点 .	助産雑誌	67	5630-538	2013
森内浩幸	.先天性・母子感染症 TORCH症候群 . NO.25(第2版) 下	日本臨牀別冊新領域別症候群シリーズ感染症症候群	25(第2版)	659-668	2013
森内浩幸	.先天性・母子感染症 先天性サイトメガロウイルス感染症 .	日本臨牀別冊新領域別症候群シリーズ感染症症候群	25(第2版)	679-685	2013